

Ảnh hưởng của Demecolcine và thời gian nuôi thành thực *in vitro* tế bào trứng đến hiệu quả tạo phôi lợn Ỉ nhân bản

Hoàng Thị Âu¹, Phạm Thị Kim Yến¹, Vũ Thị Thu Hương¹, Lê Văn Đạt¹, Nguyễn Thị Lan Anh¹,
Giang Thị Thanh Nhân¹, Phạm Doãn Lâm², Lưu Quang Minh³, Nguyễn Khánh Vân^{1*}

¹Phòng Thí nghiệm Trọng điểm Công nghệ Tế bào Động vật, Viện Chăn nuôi, 9 Tân Phong, phường Thụy Phương, quận Bắc Từ Liêm, Hà Nội, Việt Nam

²Viện Chăn nuôi, 9 Tân Phong, phường Thụy Phương, quận Bắc Từ Liêm, Hà Nội, Việt Nam

³Bộ Khoa học và Công nghệ, 113 Trần Duy Hưng, phường Trung Hòa, quận Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam

Ngày nhận bài 18/9/2023; ngày chuyển phân biên 21/9/2023; ngày nhận phân biên 11/10/2023; ngày chấp nhận đăng 16/10/2023

Tóm tắt:

Kết quả của nghiên cứu này cho thấy, nồng độ Demecolcine ảnh hưởng đến hiệu quả tạo phôi lợn Ỉ nhân bản. Nhóm 4 μM Demecolcine có tỷ lệ tế bào trứng có khối hình nón cao hơn so với nhóm 0, 6 và 8 μM (tương ứng 72,03 so với 1,98, 59,42 và 51,01%, $p<0,05$). Tỷ lệ phân chia, phôi nang của nhóm 4 μM Demecolcine cao hơn có ý nghĩa so với nhóm 6 và 8 μM ($p<0,05$). Thời gian xử lý với Demecolcine ảnh hưởng đến hiệu quả tạo phôi lợn Ỉ nhân bản. Tỷ lệ phân chia, phôi nang của nhóm 1 giờ cao hơn có ý nghĩa so với nhóm 0,5, 2 và 3 giờ (tương ứng 84,68 so với 70,92, 73,86 và 60,36%; 24,91 so với 13,62%, 17,26 và 10,63%, $p<0,05$). Thời gian nuôi thành thực *in vitro* tế bào trứng lợn ảnh hưởng đến hiệu quả tạo phôi lợn Ỉ nhân bản. Tỷ lệ tế bào trứng có khối hình nón ở nhóm 20 giờ là cao hơn có ý nghĩa so với nhóm 18 và 22 giờ (tương ứng 85,34 so với 60,04 và 72,03%, $p<0,05$). Tỷ lệ phân chia, phôi nang ở nhóm 18 giờ thấp hơn có ý nghĩa so với nhóm 20 và 22 giờ (tương ứng 66,12 so với 85,42 và 84,68%; 13,71 so với 25,48 và 24,91%, $p<0,05$). Kết luận, Demecolcine và thời gian nuôi thành thực *in vitro* có ảnh hưởng đến hiệu quả tạo phôi lợn Ỉ nhân bản.

Từ khóa: Demecolcine, phôi lợn Ỉ nhân bản, thành thực *in vitro*.

Chỉ số phân loại: 4.2

1. Đặt vấn đề

Mặc dù đã có nhiều báo cáo nói về việc tạo được động vật nhân bản bằng kỹ thuật cấy chuyển nhân tế bào soma (SCNT) ở một số loài động vật, tuy nhiên hiệu quả của phương pháp này vẫn còn thấp. Theo G.P. Malenko và cs (2015) [1], tỷ lệ tạo con non nhân bản ở các loài động vật <5%. Các nhà nghiên cứu đã thực hiện nhiều thí nghiệm nhằm cải thiện hiệu quả tạo phôi và động vật nhân bản. Để nâng cao hiệu quả việc tạo phôi động vật nhân bản, các nhà nghiên cứu đã sử dụng phương pháp tạo phôi nhân bản không có màng sáng và được ứng dụng thành công ở một số động vật như bò, ngựa và lợn [2-4]. Tạo phôi nhân bản từ tế bào trứng không có màng sáng đơn giản, hiệu quả hơn từ tế bào trứng có màng sáng [5]. Số lượng phôi nang nhân bản được tạo ra bằng phương pháp tạo phôi nhân bản không có màng sáng bằng hoặc cao hơn so với phương pháp tạo phôi nhân bản có màng sáng.

Một trong những yếu tố quan trọng đảm bảo cho sự thành công của quá trình tạo phôi nhân bản SCNT không có màng sáng chính là việc loại bỏ toàn bộ vật liệu di truyền có trong nhân của tế bào trứng nhận. Nguyên nhân là do khi loại nhân thì cũng đồng thời loại bỏ một số thành phần quan trọng có trong tế bào chất, qua đó có thể làm giảm khả năng sống của tế bào trứng nhận và ảnh hưởng tới hiệu quả tạo phôi nhân bản [6]. Demecolcine là một chất hóa học thường được sử dụng trong quá trình loại nhân tế bào trứng không có màng sáng, nó có tác dụng đẩy phần nhân

ra sát ngoại vi tế bào chất tạo thành một khối hình cầu, qua đó giúp kỹ thuật viên có thể dễ dàng nhận biết được vị trí nhân tế bào trứng dưới kính hiển vi soi nổi thông thường, từ đó dễ dàng loại bỏ phần tế bào chất có chứa nhân. Việc lựa chọn được nồng độ, thời gian tiếp xúc thích hợp của tế bào trứng với Demecolcine trước khi loại nhân giúp nâng cao hiệu quả tạo phôi nhân bản SCNT không có màng sáng.

Hiệu quả tạo phôi nhân bản sẽ được nâng cao khi sử dụng tế bào trứng có nhân thành thực ở giai đoạn MII. Thêm vào đó, tế bào chất của tế bào trứng nhận cũng phải ở giai đoạn thành thực để tế bào trứng sau khi đã được loại nhân và cấy chuyển nhân tế bào soma có thể hoàn thiện được quá trình phát triển tiếp theo của mình. Sau khi được cấy chuyển nhân và kích hoạt, phôi SCNT sẽ trải qua một số quá trình như tái tạo nhân và tái lập trình nhân. Quá trình này đòi hỏi sự có mặt của một số protein đặc hiệu có trong tế bào chất thành thực. Nhiều protein nằm trong nhân tế bào cho được giải phóng vào bên trong tế bào chất của tế bào trứng nhận và ngược lại một số protein khác có trong tế bào chất của tế bào trứng nhận sẽ được nhân tế bào cho thu nhận [7]. Trong quá trình tạo phôi lợn nhân bản bằng kỹ thuật cấy chuyển nhân SCNT, nguồn tế bào trứng nhận có thể là tế bào trứng thành thực *in vitro* [8] hoặc được thu từ *in vivo* [9]. Tuy nhiên, do số lượng tế bào trứng cần phải dùng cho quá trình tạo phôi SCNT và lợn con nhân bản lớn nên việc sử dụng tế bào trứng lợn thành thực *in vitro* là một lựa chọn hàng đầu [8]. Tế bào trứng được thu và lựa chọn từ buồng trứng lợn ở lò mổ, sau đó được lựa chọn và nuôi thành

*Tác giả liên hệ: Email: cotihin@gmail.com

Effects of demecolcine and oocyte maturation time on the efficiency in the production of Vietnamese pot-bellied pig embryos

Thi Au Hoang¹, Thi Kim Yen Pham¹, Thi Thu Huong Vu¹, Van Dat Le¹, Thi Lan Anh Nguyen¹, Thi Thanh Nhan Giang¹, Doan Lan Pham², Quang Minh Luu³, Khanh Van Nguyen^{1*}

¹Key Laboratory of Animal Cell Technology, National Institute of Animal Science, 9 Tan Phong Street, Thuy Phuong Ward, Bac Tu Liem District, Hanoi, Vietnam

²National Institute of Animal Science,

9 Tan Phong Street, Thuy Phuong Ward, Bac Tu Liem District, Hanoi, Vietnam

³Ministry of Science and Technology,

113 Tran Duy Hung Street, Trung Hoa Ward, Cau Giay District, Hanoi, Vietnam

Received 18 September 2023; revised 11 October 2023; accepted 16 October 2023

Abstract:

The results of this study showed that the concentration of Demecolcine affected efficiency in the production of Vietnamese pot-bellied pig embryos. The 4 μ M Demecolcine group resulted in a greater oocyte extrusion cones rate in comparison to 0, 6, and 8 μ M groups (72.03 vs 1.98%, 59.42, and 51.01%, $p < 0.05$, respectively). The cleavage rate and blastocyst rate in the 4 μ M Demecolcine group were significantly higher than in the 6 and 8 μ M groups ($p < 0.05$). Demecolcine treatment time affected efficiency in the production of Vietnamese pot-bellied cloned pig embryos. The cleavage and blastocyst rates of the 1 h group were significantly higher than that of the 0.5, 2 and 3 h (84.68 vs 70.92%, 73.86, and 60.36%; 24.91 vs 13.62%, 17.26 vs 10.63%, $p < 0.05$, respectively). The oocyte maturation time of porcine oocytes affected the production efficiency of Vietnamese pot-bellied cloned pig embryos. The oocyte extrusion cone rate of the 20 h group was significantly higher than that of the 18 and 22 h groups (85.34 vs 60.04, and 72.03%, $p < 0.05$, respectively). The cleavage rate and blastocyst rate in the 18 h group were significantly lower than that in the 20 and 22 h groups (66.12 vs 85.42, and 84.68%; 13.71 vs 25.48, and 24.91%, $p < 0.05$, respectively). In conclusion, Demecolcine and oocyte maturation time had effects on the efficiency in the production of Vietnamese pot-bellied pig embryos.

Keywords: Demecolcine, maturation *in vitro*, Vietnamese pot-bellied pig embryos.

Classification number: 4.2

thực *in vitro*. Tế bào trứng nhận sử dụng cho quá trình SCNT có nguồn gốc từ lò mổ nên sẽ có nhân ở các giai đoạn khác nhau trước khi được nuôi thành thực. Chính vì vậy, việc lựa chọn thời gian nuôi thành thực *in vitro* tế bào trứng sẽ ảnh hưởng đến hiệu quả tạo phôi nhân bản. Mục đích của nghiên cứu này là đánh giá được ảnh hưởng của Demecolcine và thời gian nuôi thành thực *in vitro* tế bào trứng đến hiệu quả tạo phôi lợn Ỉ nhân bản.

2. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

2.1. Vật liệu

Các hóa chất sử dụng trong nghiên cứu này được cung cấp bởi Hãng Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, Mỹ).

2.2. Phương pháp nghiên cứu

Đồng pha nguyên bào sợi lợn Ỉ: Phương pháp đồng pha nguyên bào sợi lợn Ỉ được thực hiện theo mô tả của V.K. Nguyen và cs (2021) [10]. Để đưa nhân của nguyên bào sợi lợn Ỉ về giai đoạn G0/G1 trước khi cấy chuyển, nguyên bào sợi lợn Ỉ ở lần cấy chuyển thứ 5-10 (độ phủ kín 80-90% đáy đĩa nuôi) được nuôi trong môi trường DMEM có bổ sung 0,2% huyết thanh thai bê trong 48 giờ.

Nuôi tế bào trứng lợn thành thực *in vitro*: Buồng trứng lợn thu từ lò mổ được bảo quản ở 30-35°C trong dung dịch PBS có bổ sung 100 IU penicilin/ml, 0,1 mg streptomycin/ml và vận chuyển về phòng thí nghiệm trong vòng 2-3 giờ. Thu tế bào trứng lợn từ những nang trứng có đường kính 3-6 mm trên buồng trứng bằng phương pháp chọc hút. Tế bào trứng lợn sau khi thu và lựa chọn được nuôi trong đĩa 4 giếng chứa môi trường POM1 có bổ sung EGF (10 ng/ml), eCG (1000 IU/ml), hCG (1000 IU/ml) và 1 mM dbcAMP (50 tế bào trứng/giếng) trong vòng 20-22 giờ ở điều kiện 38,5°C, 5% CO₂, độ ẩm không khí bão hòa. Sau 20-22 giờ, tế bào trứng được chuyển sang nuôi trong môi trường POM2 có bổ sung EGF (10 ng/ml), eCG (1000 IU/ml) và hCG (1000 IU/ml) ở điều kiện 38,5°C, 5% CO₂, độ ẩm không khí bão hòa.

Loại nhân tế bào trứng lợn: Sau 40-44 giờ nuôi thành thực *in vitro*, các tế bào trứng được loại bỏ toàn bộ lớp tế bào cận nhân trong môi trường TALP-HEPES có bổ sung 0,1% hyaluronidase và lựa chọn các tế bào trứng lợn thành thực cho quá trình loại nhân. Tế bào trứng thành thực sau nuôi thành thực *in vitro* là những tế bào trứng có sự xuất hiện của thể cực thứ nhất. Quá trình loại nhân được thực hiện theo phương pháp của S.M. Hosseini và cs (2013) [11] có cải biến. Tế bào trứng lợn thành thực *in vitro* trước khi loại nhân sẽ được chuyển sang môi trường loại bỏ màng sáng có chứa 1,5 μ g/ml pronase trong vòng 3-6 phút. Sau khi đã loại bỏ hoàn toàn màng sáng, tế bào trứng được rửa 3 lần trong môi trường TALP-HEPES + 10% huyết thanh thai bê, sau đó chuyển sang môi trường PZM3 có bổ sung Demecolcine. Sau khi xử lý với Demecolcine, lựa chọn những tế bào trứng có khối lõi nhân hình nón để loại nhân trong môi trường TALP-HEPES có chứa 0,5 μ g/ml Cytochalasin B. Loại bỏ một phần nhỏ tế bào chất (5-10% thể tích tế bào trứng) có chứa hình nón lõi ra trên màng tế bào trứng bằng micro pipette dưới kính hiển vi soi nổi có độ phóng đại 100 lần.

Cấy chuyển nhân SCNT (nguyên bào sợi): Tế bào trứng sau loại nhân được chuyển vào dung dịch chứa 1 mg/ml Phytohemagglutinin (PHA) trong 2-3 giây để dính với 1 tế bào cho (nguyên bào sợi lợn Ỉ) và tạo cặp tế bào cho - tế bào trứng nhận. Cặp tế bào cho - tế bào trứng nhận sau khi đã dính với nhau được chuyển sang dung dịch dung hợp, để 2-3 phút cho đến khi tế bào chìm hẳn xuống đáy đĩa thì chuyển sang buồng dung hợp có chứa môi trường dung hợp và kết nối với máy dung hợp để dung hợp ở 1,2 kV/cm trong thời gian 30 μ s. Sau dung hợp các cặp tế

bào cho - tế bào trứng nhận được chuyển vào môi trường PZM3 ở điều kiện 38,5°C, 5% CO₂, 5% O₂ và độ ẩm không khí bão hòa. Sau 2 giờ lựa chọn các cặp tế bào cho - tế bào trứng nhận đã dung hợp được để hoạt hóa tái cấu trúc.

Hoạt hóa tế bào trứng sau cấy chuyển nhân và nuôi phôi in vitro: Các cặp tế bào cho - tế bào trứng nhận đã dung hợp sẽ được xung điện lại ở 1 kV/cm trong thời gian 80 μs tại thời điểm 2 giờ sau dung hợp, sau đó chuyển sang môi trường hoạt hóa PZM3 có bổ sung 7,5 μg/ml CyB trong vòng 3 giờ ở điều kiện 38,5°C, 5% CO₂, 5% O₂ và độ ẩm không khí bão hòa. Sau 3 giờ trong môi trường hoạt hóa, các hợp tử giả định sẽ được chuyển sang nuôi trong hệ thống microwell có chứa môi trường PZM3 ở điều kiện 38,5°C, 5% CO₂, 5% O₂ và độ ẩm không khí bão hòa. Bổ sung 10% huyết thanh thai bê vào môi trường nuôi PZM3 ở ngày thứ 5 sau hoạt hóa (ngày hoạt hóa được coi là ngày 0). Đánh giá khả năng phân chia, tạo phôi nang ở ngày thứ 2 và thứ 7 sau hoạt hóa.

Phương pháp nhuộm Hoechst 33342:

- Chuẩn bị 3 loại môi trường: (1) Hoechst 33342 stock: 250 μg Hoechst 33342/ml Ethanol tuyệt đối; (2) Dung dịch nhuộm phôi: 50 μl Hoechst 33342 stock + 450 μl Ethanol tuyệt đối; (3) Dung dịch rửa phôi: PBS + 0,3% PVP.

- Rửa phôi trong dung dịch PBS có bổ sung 0,3% PVP, tiếp theo chuyển phôi vào dung dịch nhuộm phôi để qua đêm ở 4°C.

- Cố định phôi sau nhuộm lên lam kính: Chuẩn bị đĩa 4 giếng: giếng 1 chứa 500 μl Ethanol tuyệt đối; giếng 2 chứa 1 ml Glycerol. Hút phôi sau khi đã nhuộm vào giếng 1 để rửa phôi, sau đó chuyển phôi sang giếng 2 và rửa phôi trong dung dịch Glycerol. Sau khi phôi được rửa trong Glycerol, chuyển phôi sang lam kính, mỗi phôi một giọt và xếp hàng dọc theo chiều dọc lam kính. Đặt lam lên lam kính, soi kiểm tra dưới kính hiển vi huỳnh quang.

Phương pháp xử lý số liệu: Số liệu được xử lý thống kê bằng phần mềm Microsoft Excel 2010, sự sai khác có ý nghĩa được kiểm tra bằng hàm ANOVA, sự sai khác có ý nghĩa với p<0,05.

3. Kết quả và bàn luận

3.1. Ảnh hưởng của nồng độ Demecolcine đến hiệu quả tạo phôi lợn Ỉ nhân bản

Trong thí nghiệm này, chúng tôi sử dụng các tế bào trứng lợn được nuôi thành thực *in vitro* 22 giờ trong môi trường POM1 và 22 giờ trong môi trường POM2. Các tế bào trứng lợn sau nuôi thành thực *in vitro* và loại bỏ màng sáng sẽ được chuyển vào môi trường PZM3 có bổ sung 0, 4, 6 và 8 μM Demecolcine trong thời gian 1 giờ. Đánh giá ảnh hưởng của nồng độ Demecolcine đến hiệu quả tạo phôi lợn Ỉ nhân bản dựa vào tỷ lệ tế bào trứng lỗi nhân, tế bào trứng phân chia, phôi nang và trung bình tổng số tế bào/phôi. Kết quả được thể hiện ở bảng 1.

Kết quả bảng 1 cho thấy, tỷ lệ tế bào trứng lỗi nhân (có khối hình nón) ở nồng độ 4 μM Demecolcine cao hơn có ý nghĩa so với nồng độ 0, 6 và 8 μM (tương ứng 72,03 so với 1,98, 59,42 và 51,01%, p<0,05). Tỷ lệ tế bào trứng phân chia, phôi nang và trung bình tổng số tế bào/phôi nang ở nồng độ 4 μM Demecolcine cao hơn có ý nghĩa so với nồng độ 6 và 8 μM (p<0,05) (bảng 1).

Bảng 1. Ảnh hưởng của nồng độ Demecolcine đến hiệu quả tạo phôi lợn Ỉ nhân bản.

Nồng độ Demecolcine (μM)	Số tế bào trứng được xử lý với Demecolcine	Tế bào trứng lỗi nhân (n, %, Mean±SE)	Số tế bào trứng được cấy chuyển nhân	Tế bào trứng phân chia (n, %, Mean±SE)	Phôi nang (n, %, Mean±SE)	Trung bình tổng số tế bào/phôi nang
0	204	4 1,98±2,01	0	0	0	0
4	220	158 72,03±1,86	129	110 84,68±2,19	32 24,91±2,05	46,03±2,76
6	196	116 59,42±2,32	94	70 74,71±1,88	16 17,26±1,76	38,24±1,76
8	212	108 51,01±1,78	87	61 70,23±2,09	12 13,98±2,34	38,42±2,14

Thí nghiệm được thực hiện với 5 lần lặp lại, các giá trị trong cùng một cột có chữ cái khác nhau là sai khác có ý nghĩa (p<0,05).

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cũng tương tự như các báo cáo của X.C. Li và cs (2007) [6], K. Miyoshi và cs (2008) [12]. Các tác giả này nhận thấy, việc sử dụng các nồng độ Demecolcine sẽ ảnh hưởng đến tỷ lệ tế bào trứng lỗi nhân, tế bào trứng phân chia, phôi nang nhân bản. Tuy nhiên theo X.C. Li và cs (2007) [6], sử dụng Demecolcine ở nồng độ 5 μM cho tỷ lệ tế bào trứng lỗi nhân cao hơn. Trong khi đó, kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy nồng độ Demecolcine thích hợp sử dụng cho quá trình loại nhân là 4 μM. Sự khác nhau giữa các kết quả nghiên cứu có thể là do điều kiện thí nghiệm, nguồn gốc tế bào trứng, khả năng quan sát đánh giá của kỹ thuật viên... Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng tế bào trứng lợn còn X.C. Li và cs (2007) [6] sử dụng tế bào trứng bò.

Demecolcine là một chất ức chế hóa học có tác dụng đẩy phần nhân tế bào trứng thành thực ra sát ngoại vi tế bào trứng, tạo thành một khối hình nón giúp cho kỹ thuật viên có thể dễ dàng quan sát dưới kính hiển vi soi nổi thông thường, nhờ vậy mà quá trình loại nhân trở nên dễ dàng hơn. X.J. Yin và cs (2002) [13] nhận thấy, khi xử lý tế bào trứng lợn thành thực *in vitro* với Demecolcine sẽ hình thành khối lõi hình nón của tế bào chất trên bề mặt tế bào trứng. Dưới tác động của Demecolcine tất cả nhiễm sắc thể của tế bào trứng sẽ tập trung ở trong khối hình nón, qua đó trong quá trình loại nhân kỹ thuật viên chỉ cần loại bỏ toàn bộ phần tế bào chất lõi lên [12]. Đây có thể là nguyên nhân mà B.G. Jeon và cs (2011) [14] cho rằng, khi sử dụng Demecolcine trong quá trình loại nhân tế bào trứng sẽ nâng cao được hiệu quả loại nhân, thậm chí tỷ lệ loại nhân thành công có thể lên tới 95,7%. Mặc dù cơ chế hoạt động của Demecolcine chưa được hiểu hết, nhưng sự xuất hiện của khối hình nón có thể liên quan đến sự ngưng tụ của nhiễm sắc thể [6]. Trong nghiên cứu của chúng tôi, chỉ có 1,98% tế bào trứng không được xử lý với Demecolcine có hiện tượng lỗi nhân, tuy nhiên kích thước của những khối hình nón này nhỏ hơn đáng kể so với hình nón của tế bào trứng được xử lý với Demecolcine.

3.2. Ảnh hưởng của thời gian xử lý tế bào trứng lợn thành thực in vitro với Demecolcine đến hiệu quả tạo phôi lợn Ỉ nhân bản

Dựa vào kết quả nghiên cứu ở nội dung 3.1, chúng tôi xử lý các tế bào trứng lợn được nuôi thành thực *in vitro* 22 giờ trong môi trường POM1 và 22 giờ trong môi trường POM2 với 4 μM Demecolcine để đánh giá ảnh hưởng của thời gian xử lý tế bào

trứng lợn thành thực *in vitro* với Demecolcine đến hiệu quả tạo phôi lợn I nhân bản ở các mức thời gian: 0,5, 1, 2 và 3 giờ. Đánh giá ảnh hưởng của thời gian xử lý tế bào trứng lợn thành thực *in vitro* với Demecolcine đến quá trình loại nhân tạo phôi lợn I nhân bản dựa vào tỷ lệ tế bào trứng lõi nhân, tế bào trứng phân chia, phôi nang và trung bình tổng số tế bào/phôi. Kết quả được thể hiện ở bảng 2.

Bảng 2. Ảnh hưởng của thời gian xử lý tế bào trứng lợn thành thực *in vitro* với Demecolcine đến hiệu quả tạo phôi lợn I nhân bản.

Thời gian (giờ)	Số tế bào trứng được xử lý với Demecolcine	Tế bào trứng lõi nhân (n, %, Mean ±SE)	Số tế bào trứng được cấy chuyển nhân	Tế bào trứng phân chia (n, %, Mean ±SE)	Phôi nang (n, %, Mean ±SE)	Trung bình tổng số tế bào/phôi nang
0,5	231	118 51,34±1,56	96	68 70,92±2,33	13 13,62±2,14	45,77±2,21
1	220	158 72,03±1,86	129	110 84,68±2,19	32 24,91±2,05	46,03±2,76
2	226	185 81,96±1,67	148	109 73,86±1,91	16 17,26±1,76	38,24±1,76
3	242	194 80,26±1,55	156	94 60,36±1,82	16 10,63±2,11	38,42±2,14

Thí nghiệm được thực hiện với 5 lần lặp lại, các giá trị trong cùng một cột có chữ cái khác nhau là sai khác có ý nghĩa (p<0,05).

Kết quả bảng 2 cho thấy, tỷ lệ tế bào trứng lõi nhân ở nhóm 2 giờ (81,96%) và 3 giờ (80,26%) cao hơn có ý nghĩa so với nhóm 0,5 giờ (51,34%) và 1 giờ (72,03%) (bảng 2, p<0,05), sự sai khác giữa nhóm 2 và 3 giờ là không có ý nghĩa (p>0,05). Kết quả này tương tự như báo cáo của X.C. Li và cs (2007) [6] nhưng lại khác so với K. Miyoshi và cs (2008) [12]. Theo X.C. Li và cs (2007) [6], tế bào trứng được xử lý với Demecolcine trong vòng 2 giờ cho tỷ lệ lõi nhân cao nhất, trong khi đó theo K. Miyoshi và cs (2008) [12], tỷ lệ tế bào trứng lõi nhân cao nhất khi tế bào trứng được xử lý với Demecolcine trong vòng 1 giờ. Trong nghiên cứu của chúng tôi, tỷ lệ tế bào trứng phân chia, phôi nang ở nhóm 1 giờ cao hơn có ý nghĩa so với nhóm 0,5, 2 và 3 giờ (tương ứng 84,68 so với 70,92%, 73,86 và 60,36%; 24,91 so với 13,62, 17,26 và 10,62%, p<0,05). Trung bình tổng số tế bào/phôi nang của nhóm 0,5 và 1 giờ cao hơn có ý nghĩa so với nhóm 2 và 3 giờ (tương ứng 45,77 và 46,03 so với 38,24 và 38,42, bảng 2). Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy, thời gian tế bào trứng lợn tiếp xúc với Demecolcine ảnh hưởng đến tỷ lệ tế bào trứng lõi nhân cũng như tỷ lệ phôi nang lợn I nhân bản.

Kết quả của chúng tôi khác so với nghiên cứu X.C. Li và cs (2007) [6]. Theo nhóm tác giả này, thời gian tế bào trứng tiếp xúc với Demecolcine chỉ ảnh hưởng đến tỷ lệ tế bào trứng lõi nhân, không ảnh hưởng đến tỷ lệ tế bào trứng phân chia và tạo phôi nang sau cấy chuyển nhân; không có sự sai khác có ý nghĩa về tỷ lệ tế bào trứng phân chia và tạo phôi nang, nhưng tỷ lệ tế bào trứng phân chia và tạo phôi nang cao nhất là ở nhóm 0,5 giờ.

Demecolcine tác động đến tế bào trứng và làm gia tăng số lượng tế bào trứng lõi nhân tại thời điểm 0,5 giờ. Sự xuất hiện của các khối hình nón sẽ hỗ trợ cho quá trình loại nhân trở nên hiệu quả

hơn mà không cần phải sử dụng kính hiển vi huỳnh quang. Theo M. Kawakami và cs (2003) [15], sợi thoi vô sắc của tế bào trứng sau giảm phân dưới tác động của Demecolcine sẽ bị xáo trộn và làm cho các nhiễm sắc thể bị cô đặc lại. Các nhiễm sắc thể cô đặc sẽ tạo thành một khối và di chuyển ra sát phần ngoại vi của tế bào trứng, hình thành nên khối lõi dạng hình nón.

Bản chất của Demecolcine là chất gây đứt gãy các vi ống, chính vì thế khi tế bào trứng tiếp xúc quá lâu với Demecolcine có thể gây ra những ảnh hưởng bất lợi đến khả năng phát triển tiếp theo của tế bào trứng sau cấy chuyển nhân [12]. Đây có thể là một trong những nguyên nhân giải thích cho hiện tượng thời gian tế bào trứng tiếp xúc với Demecolcine càng lâu sẽ làm giảm tỷ lệ hình thành phôi nang trong nghiên cứu của chúng tôi (bảng 2).

3.3. Ảnh hưởng của thời gian nuôi thành thực *in vitro* tế bào trứng đến hiệu quả tạo phôi lợn I nhân bản

Với kết quả đạt được của nội dung 3.1 và 3.2, chúng tôi đánh giá ảnh hưởng của thời gian nuôi thành thực *in vitro* tế bào trứng đến quá trình loại nhân tạo phôi lợn I nhân bản với các tế bào trứng được xử lý với 4 μM Demecolcine trong vòng 1 giờ. Các tế bào trứng lợn trước khi xử lý sẽ được nuôi thành thực trong POM1 22 giờ, sau đó nuôi thành thực trong POM2 trong 18, 20 và 22 giờ. Đánh giá ảnh hưởng của thời gian nuôi thành thực *in vitro* tế bào trứng đến quá trình loại nhân tạo phôi lợn I nhân bản dựa vào tỷ lệ tế bào trứng lõi nhân, tế bào trứng phân chia, phôi nang và trung bình tổng số tế bào/phôi. Kết quả được thể hiện ở bảng 3.

Bảng 3. Ảnh hưởng của thời gian nuôi thành thực *in vitro* tế bào trứng đến hiệu quả tạo phôi lợn I nhân bản.

Thời gian nuôi thành thực <i>in vitro</i> trong POM2	Số tế bào trứng được xử lý với Demecolcine	Tế bào trứng lõi nhân (n, %, Mean±SE)	Số tế bào trứng được cấy chuyển nhân	Tế bào trứng phân chia (n, %, Mean±SE)	Phôi nang (n, %, Mean±SE)	Trung bình tổng số tế bào/phôi nang
18 giờ	214	128 60,04±1,88	103	68 66,12±1,97	14 13,71±1,64	39,29±1,99
20 giờ	241	205 85,34±2,06	174	148 85,42±1,93	44 25,48±1,78	46,86±2,42
22 giờ	220	158 72,03±1,86	129	110 84,68±2,19	32 24,91±2,05	46,03±2,76

Thí nghiệm được thực hiện với 5 lần lặp lại, các giá trị trong cùng một cột có chữ cái khác nhau là sai khác có ý nghĩa (p<0,05).

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy, tỷ lệ tế bào trứng lõi nhân ở nhóm tế bào trứng được nuôi thành thực *in vitro* 20 giờ trong POM2 là cao hơn có ý nghĩa so với nhóm được nuôi thành thực *in vitro* 18 và 22 giờ trong POM2 (tương ứng 85,34% so với 60,04 và 72,03%, p<0,05). Tỷ lệ tế bào trứng phân chia, phôi nang, trung bình tổng số tế bào/phôi nang ở nhóm tế bào trứng được nuôi thành thực *in vitro* 18 giờ trong POM2 là thấp hơn có ý nghĩa so với nhóm được nuôi thành thực *in vitro* 20 và 22 giờ trong POM2 (tương ứng 66,12% so với 85,42 và 84,68%; 13,71 so với 25,48 và 24,91%; 39,29 so với 46,86 và 46,03, p<0,05). Kết quả bảng 3 cho thấy, mặc dù không có sự khác biệt về tỷ lệ tạo phôi nang ở nhóm

20 và 22 giờ, tuy nhiên tỷ lệ tế bào trứng lỗi nhân ở nhóm 20 giờ cao hơn có ý nghĩa so với nhóm 22 giờ.

Kết quả này cho thấy, thời gian nuôi thành thực *in vitro* tế bào trứng ảnh hưởng đến hiệu quả tạo phôi lợn Ỉ nhân bản. Kết quả này của chúng tôi tương tự như nghiên cứu của X.C. Li và cs (2007) [6]. Theo đó, thời gian nuôi thành thực *in vitro* ảnh hưởng đến tỷ lệ tế bào trứng bò lỗi nhân và hiệu quả tạo phôi bò nhân bản. Nhóm tác giả này cũng cho rằng, thời gian nuôi thành thực *in vitro* quá dài sẽ làm giảm tỷ lệ tế bào trứng lỗi nhân, tỷ lệ tế bào trứng phân chia và phôi nang. Hiện tượng tế bào trứng lợn không cùng đạt tới giai đoạn MII thường xảy ra trong quá trình thành thực *in vitro* [16]. Theo K. Miyoshi và cs (2003) [16], có tới 36% tế bào trứng lợn đạt tới giai đoạn MII tại thời điểm nuôi 24 giờ. Thời gian nuôi thành thực *in vitro* ảnh hưởng đến việc tế bào chất tế bào trứng nhận hỗ trợ cho sự phát triển của phôi nhân bản [17]. Giai đoạn thành thực của tế bào trứng nhận ảnh hưởng đến khả năng phát triển *in vitro* của tế bào trứng nhận sau cấy chuyển nhân SCNT và tỷ lệ hình thành phôi nang.

Trong nghiên cứu của chúng tôi, việc sử dụng tế bào trứng lợn được nuôi thành thực *in vitro* 20 hoặc 22 giờ trong POM2 cho tỷ lệ tế bào trứng lỗi nhân cũng như tạo phôi nang cao. Nguyên nhân có thể là do tại thời điểm này, tỷ lệ tế bào trứng lợn đạt tới giai đoạn MII nhiều nhất. Các tế bào trứng thành thực ở giai đoạn MII thường được sử dụng để làm tế bào chất nhận trong các nghiên cứu tạo phôi nhân bản bằng kỹ thuật cấy chuyển nhân SCNT. Ở giai đoạn MII, các yếu tố liên quan đến quá trình giảm phân và thúc đẩy quá trình hình thành nguyên phân của tế bào trứng giảm hoạt động, tế bào chất của tế bào trứng nhận sẽ ở giai đoạn nghỉ ngơi và điều này làm cho tế bào trở nên phù hợp cho quá trình cấy chuyển nhân tạo phôi nhân bản. Tỷ lệ tế bào trứng nhận ở giai đoạn MI phát triển đến phôi nang thấp hơn có ý nghĩa so với tế bào trứng nhận ở giai đoạn MII [16]. Theo E. Ibanez và cs (2003) [18], có thể tạo được phôi nang nhân bản từ các tế bào trứng nhân đã được loại bỏ nhân ở giai đoạn Telophase I. Tuy nhiên, việc giảm các yếu tố thúc đẩy sự thành thực có thể làm giảm khả năng sống của tế bào trứng sau loại nhân và cấy chuyển SCNT [19].

4. Kết luận

Việc xử lý tế bào trứng nhận được nuôi thành thực *in vitro* 20 giờ trong POM2 với 4 μ M Demecolcine trong vòng 1 giờ nâng cao hiệu quả tạo phôi lợn Ỉ nhân bản với tỷ phôi nang lên đạt 25,48%.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu được thực hiện tại Phòng Thí nghiệm Trọng điểm Công nghệ Tế bào Động vật, Viện Chăn nuôi với sự hỗ trợ kinh phí từ đề tài: “Nghiên cứu hoàn thiện quy trình tạo lợn Ỉ nhân bản”, thuộc Đề án phát triển công nghệ sinh học ngành nông nghiệp đến năm 2030. Các tác giả xin trân trọng cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] G.P. Malenko, A.V. Komissarov, O.I. Stepanov, et al. (2015), “Perspective of Zona-free method use in farm animal cloning”, *Agricultural Biology*, **50(4)**, pp.420-430, DOI: 10.15389/agrobiol.2015.4.420eng.
- [2] P.J. Booth, B.J. Tan, R. Relpurth, et al. (2001a), “Simplification of bovine somatic cell nuclear transfer by application of a zona-free manipulation technique”, *Cloning Stem Cells*, **3(3)**, pp.139-150, DOI: 10.1089/153623001753205098.
- [3] C. Galli, I. Lagutina, G. Crotti, et al. (2003), “Pregnancy: A cloned horse born to its dam twin”, *Nature*, **424(6949)**, DOI: 10.1038/424635a.
- [4] P.J. Booth, P. Holm, H. Callesen (2001b), “Application of the zona-free manipulation technique to porcine somatic cells nuclear transfer”, *Cloning Stem Cells*, **3(4)**, pp.191-197, DOI: 10.1089/15362300152725909.
- [5] I. Lagutina, G. Lazzari, R. Duchi, et al. (2007), “Comparative aspects of somatic cell nuclear transfer with conventional and zona-free method in cattle, horse, pig and sheep”, *Theriogenology*, **67(1)**, pp.90-98, DOI: 10.1016/j.theriogenology.2006.09.011.
- [6] X.C. Li, Y. Zhang, S. Hua, et al. (2007), “The use of demecolcine enucleation of bovine oocytes”, *Belg. J. Zool.*, **137(2)**, pp.209-214.
- [7] K.M. Whitworth, R.S. Prather (2010), “Somatic cell nuclear transfer efficiency: How can it be improved through nuclear remodelling and reprogramming”, *Molecular Reproduction Development*, **77(12)**, pp.1001-1015, DOI: 10.1002/mrd.21242.
- [8] J. Beththausen, E. Forsberg, M. Augenstein, et al. (2000), “Production of cloned pigs from *in vitro* systems”, *Nature Biotechnology*, **18(10)**, pp.1055-1059, DOI: 10.1038/80242.
- [9] A. Onishi, M. Iwamoto, T. Akita, et al. (2000), “Pig cloning by microinjection of fetal fibroblast nuclei”, *Science*, **289(5482)**, pp.1188-1190, DOI: 10.1126/science.289.5482.1188.
- [10] V.K. Nguyen, T. Somfai, D. Salamone, et al. (2021), “Optimization of donor cell cycle synchrony, maturation media and embryo culture system for somatic cell nuclear transfer in the critically endangered Vietnamese I pig”, *Theriogenology*, **166**, pp.21-28, DOI: 10.1016/j.theriogenology.2021.02.008.
- [11] S.M. Hosseini, F. Moulavi, V. Asgari, et al. (2013), “Simple, fast, and efficient method of manual oocyte enucleation using a pulled Pasteur pipette”, *In vitro Cell Dev. Biol. Anim.*, **49(8)**, pp.569-575, DOI: 10.1007/s11626-013-9630-4.
- [12] K. Miyoshi, H. Mori, H. Yamamoto, et al. (2008), “Effects of Demecolcine and sucrose on the incidence of cytoplasmic protrusions containing chromosomes in pig oocytes matured *in vitro*”, *Journal of Reproduction and Development*, **54(2)**, pp.117-121, DOI: 10.1262/jrd.19142.
- [13] X.J. Yin, T. Tani, I. Yonemura, et al. (2002), “Production of cloned pig from adult somatic cells by chemically assisted removal of maternal chromosomes”, *Biology Reproduction*, **67(2)**, pp.442-446, DOI: 10.1095/biolreprod67.2.442.
- [14] B.G. Jeon, D.H. Betts, W.A. King, et al. (2011), “*In vitro* developmental potential of nuclear transfer embryos cloned with enucleation methods using pre-denuded bovine oocytes”, *Reproduction Domestic Animal*, **46(6)**, pp.1035-1042, DOI: 10.1111/j.1439-0531.2011.01781.x.
- [15] M. Kawakami, A. Yabuuchi, T. Kobayashi, et al. (2003), “Effect of demecolcine and nocodazole on the efficiency of chemically assisted removal of chromosomes and the development potential of nuclear transferred porcine oocytes”, *Cloning Stem. Cells*, **5(4)**, pp.379-387, DOI: 10.1089/153623003772032871.
- [16] K. Miyoshi, J. Rzuclidlo, S. Pratt, et al. (2003), “Improvements in cloning efficiencies may be possible by increasing uniformity in recipient oocytes and donor cells”, *Biology of Reproduction*, **68(4)**, pp.1079-1086, DOI: 10.1095/biolreprod.102.010876.
- [17] K. Miyoshi, J. Rzuclidlo, S. Pratt, et al. (2002), “Utility of rapidly matured oocytes as recipients for production of cloned embryos from somatic cells in the pig”, *Biology Reproduction*, **67(2)**, pp.540-545, DOI: 10.1095/biolreprod67.2.540.
- [18] E. Ibanez, D.F. Albertini, E.W. Overstrom (2003), “Demecolcine induced oocytes enucleation for somatic cell cloning: Coordination between cell cycle egress, kinetics of cortical cytoskeletal interactions, and second polar body extrusion”, *Biology Reproduction*, **68(4)**, pp.1249-1258, DOI: 10.1095/biolreprod.102.008292.
- [19] T. Tani, Y. Kato, Y. Tsunoda (2001), “Direct exposure of chromosomes to nonactivated ovum cytoplasm is effective for bovine somatic cell nucleus reprogramming”, *Biology Reproduction*, **64(1)**, pp.324-330, DOI: 10.1095/biolreprod64.1.324.