

4. KẾT LUẬN

Đã tạo thành công vector CRISPR pX459 chứa đoạn gRNA nhắm đến vùng exon7 của gen thụ thể CD163 và chuyển thành công vào tế bào nguyên bào sợi lợn để tạo được tế bào đột biến vùng exon7 gây bất hoạt thụ thể CD163 nhằm kháng virus gây bệnh tai xanh..

Sử dụng kết quả nghiên cứu này để tạo phôi và lợn nhân bản có khả năng kháng virus gây bệnh tai xanh.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Burkard C., Opriessnig T., Mileham A.J., Stadejek T., Ait-Ali T., Lilloco S.G., Whitelaw C.B.A. and Archibald A.L. (2018). Pigs lacking the scavenger receptor cysteine-rich domain 5 of CD163 are resistant to porcine reproductive and respiratory syndrome virus 1 infection. *J. Virol.*, **13**(2): e1006206. doi: 10.1371/journal.ppat.1006206.
- Calvert J.G., Slade D.E., Shields S.L., Jolie R., Mannan R.M., Ankenbauer R.G. and Welch S.K.W. (2007). CD163 expression confers susceptibility to porcine reproductive and respiratory syndrome viruses. *J. Virol.*, **81**: 7371-79.
- Guo C., Wang M., Zhu Z., He S., Liu H., Liu X., Shi X., Tang T., Yu P. and Zeng J. (2019). Highly efficient generation of pigs harboring a partial deletion of the CD163 SRCR5 domain, which are fully resistant to porcine reproductive and respiratory syndrome virus 2 infection. *Front. Immunol.* **10**: 1846.
- Kato-Inui T., Takahashi G., Hsu S. and Miyaoka Y. (2018). Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/CRISPR-associated protein 9 with improved proof-reading enhances homology-directed repair. *Nucleic Acids Res.* **46**: 4677-4688. <https://doi.org/10.1093/nar/gky264>.
- Ma H., Jiang L., Qiao S., Zhi Y., Chen X.X., Yang Y., Huang X., Huang M., Li R. and Zhang G.P. (2017). The crystal structure of the fifth scavenger receptor cysteine-rich domain of porcine CD163 reveals an important residue involved in porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection. *J. Virol.*, **91**(3): e01897-16. doi: 10.1128/JVI.01897-16.
- Pan J., Lin Z., Wen J., Guo J., Wu X., Liu Y., Lai W., Liang Q., Xie Y. and Chen Y. (2021). Application of the Modified Cytosine Base-Editing in the Cultured Cells of Bama Minipig.
- Patton J.B., Rowland R.R., Yoo D. and Chang K.O. (2009). Modulation of CD163 receptor expression and replication of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in porcine macrophages. *Virus Res.*, **140**: 161-71.
- Schaer D.J., Christian A.S., Paul W.B., Robert A.B., Gabriele S., Abdu I.A. and Andreas S. (2006). CD163 is the macrophage scavenger receptor for native and chemically modified hemoglobins in the absence of haptoglobin. *Blood*, **107**(1): 373-80.
- Wang H., Shen L., Chen J., Liu X., Tan T., Hu Y., Bai X., Li Y., Tian K. and Li N. (2019). Deletion of CD163 exon 7 confers resistance to highly pathogenic porcine reproductive and respiratory viruses on pigs. *Int. J. Biol. Sci.*, **15**: 1993.
- Whitworth K.M., Lee K., Benne J.A., Beaton B.P., Spate L.D., Murphy S.L., Samuel M.S., Mao J., O'Gorman C., Walters E.M., Murphy C.N., Driver J., Mileham A., McLaren D., Wells K.D. and Prather R.S. (2014). Use of the CRISPR/Cas9 System to Produce Genetically Engineered Pigs from In Vitro-Derived Oocytes and Embryos. *Biol. Rep.*, **91**. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.114.121723>.
- Whitworth K.M., Rowland R.R., Ewen C.L., Tribble B.R., Kerrigan M.A., Cino-Ozuna A.G., Samuel M.S., Lightner J.E., McLaren D.G. and Mileham A.J. (2016). Gene-edited pigs are protected from porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Nat. Biotechnol.*, **34**: 20-22.
- Yang H., Zhang J., Zhang X., Shi J., Pan Y., Zhou R., Li G., Li Z., Cai G. and Wu Z. (2018). CD163 knockout pigs are fully resistant to highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Antiviral Res.*, **151**: 63-70.

ẢNH HƯỞNG GIAI ĐOẠN BỔ SUNG YẾU TỐ TĂNG TRƯỞNG NỘI MAO MẠCH TRONG MÔI TRƯỜNG NUÔI THÀNH THỰC TẾ BÀO TRỨNG ĐẾN SỰ THÀNH THỰC NHÂN VÀ PHÁT TRIỂN CỦA PHÔI ĐƠN TÍNH Ở HEO THU TỬ NANG NOĂN NHỎ

Nguyễn Thanh Ngân¹ và Nguyễn Ngọc Tấn^{1*}

Ngày nhận bài báo: 10/10/2022 - Ngày nhận bài phản biện: 20/10/2022

Ngày bài báo được chấp nhận đăng: 12/11/2022

¹ Trường Đại học Nông Lâm Tp. Hồ Chí Minh

* Tác giả liên hệ: TS. Nguyễn Ngọc Tấn, Giảng viên chính. Khoa Khoa học Sinh học - Trường ĐH Nông Lâm Tp. Hồ Chí Minh; Điện thoại: 0948 993 338; Email: nntan@hcmuaf.edu.vn.

TÓM TẮT

Mục tiêu của nghiên cứu này là đánh giá ảnh hưởng của thời điểm bổ sung yếu tố tăng trưởng nội mao mạch (VEGF) trong môi trường nuôi cấy thành thực (IVM) đến tỷ lệ thành thực nhân và phát triển phôi đơn tính từ nguồn tế bào trứng heo thu nhận từ nang noãn nhỏ. Phức hợp tế bào trứng-cumulus (COC) có từ 2 lớp cumulus trở lên sau khi được thu nhận từ nang noãn nhỏ (SF) được lựa chọn đưa vào nuôi cấy với các thời điểm bổ sung VEGF khác nhau trong IVM. Kết quả cho thấy tỷ lệ thành thực về nhân của tế bào trứng thu từ MF cao hơn so SF khi không bổ sung VEGF (74,6 và 45,4%; $P < 0,05$). Ở các thời điểm bổ sung VEGF khác nhau, tỷ lệ thành thực về nhân cao nhất khi bổ sung VEGF ở nhóm tế bào trứng thu từ SF trong 22 giờ đầu IVM (73,9%), tiếp đến là 44 giờ (71,2%), sau đó là 22 giờ sau (58,5%) và được ghi nhận là thấp nhất khi không bổ sung VEGF (45,4%). Đặc biệt, khi bổ sung VEGF ở nhóm tế bào trứng SF trong suốt 44 giờ và 22 giờ đầu của IVM cho kết quả về tỷ lệ thành thực nhân không khác biệt có ý nghĩa so với nhóm tế bào trứng thu từ MF khi không bổ sung VEGF (74,6%; $P > 0,05$). Sau quá trình IVM, các tế bào trứng có xuất hiện thể cực thứ nhất được kích hoạt phôi đơn tính bằng ethanol 7% kết hợp với $2,5\mu\text{M}$ 6-DMAP. Tỷ lệ phân chia tế bào và hình thành phôi nang khi bổ sung VEGF trong giai đoạn suốt 44 giờ (lần lượt là 70,7 và 24,4%) và 22 giờ đầu (lần lượt là 74,3 và 28,3%) của IVM ở nhóm tế bào trứng SF khác biệt không có ý nghĩa so với nhóm tế bào trứng thu từ MF khi không bổ sung VEGF (79,9 và 31,7%; $P > 0,05$). Vì vậy, việc bổ sung VEGF ở nồng độ 250 ng/ml vào môi trường ở 22 giờ đầu hoặc suốt 44 giờ của IVM không những giúp cải thiện tỷ lệ thành thực nhân mà còn giúp nâng cao hiệu quả sản xuất phôi đơn tính của tế bào trứng heo thu từ nang noãn nhỏ trong điều kiện *in vitro*.

Từ khóa: Nuôi cấy thành thực, tế bào trứng heo, nang noãn nhỏ, VEGF, phôi đơn tính.

ABSTRACT

Stage-dependent effect of Vascular Endothelial Growth Factor protein in the maturation medium on nuclear maturation and developmental competence of parthenogenetic embryos of porcine oocytes derived from small follicles

This study aimed to evaluate the stage-dependent effect of VEGF protein supplementation in maturation medium on nuclear maturation and further parthenogenetic embryos development of porcine oocytes derived from small follicles. Cumulus-Oocyte Complexes (COCs) with more than 2 layers were collected from medium follicles (MF) and small follicles (SF) for *in vitro* maturation (IVM) in 44hrs, the oocyte with the first polar body was subjected to parthenogenetic activation by ethanol. Result showed that the nuclear maturation rate of MF-derived oocytes was significantly higher than SF-derived oocytes in condition of without VEGF supplementation (74.6 and 45.4%, $P < 0.05$). Furthermore, the result also indicated that the stage-dependent effect of VEGF supplementation in maturation medium on nuclear maturation, cleavage rate and blastocyst formation of SF-derived oocytes was found. The percentage of nuclear maturation was highest in SF-derived oocytes supplemented with VEGF during the first 22hrs of IVM (73.9%) as compared to the 44hr-treated group (71.2%), last-22hr-treated group (58.5%) and non-treated group (45.4%). Meanwhile, no significant differences between non-treated MF-derived (74.6%, $P > 0.05$), first-22hr and 44hrs group after IVM were observed. After parthenogenetically activation was applied, the cleavage and blastocysts rate in SF-derived oocytes of the 44hr-treated group (70.7 and 24.4%, respectively) and first-22hr-treated group (74.3 and 28.3%, respectively) also showed no significant differences to MF group (79.9 and 31.7%, respectively, $P > 0.05$). In conclusion, supplementing 250 ng/ml of VEGF during the first 22hrs or entire 44hrs of IVM not only enhance the nuclear maturation but also increase the cleavage rate and blastocyst formation of oocytes derived from small follicles.

Keywords: Porcine oocytes, *in vitro* maturation, small follicles, VEGF, parthenogenetic embryos.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Nhiều thành tựu đạt được trong thời gian qua về công nghệ phôi nói chung và phôi *in*

vitro nói riêng. Tuy nhiên, tế bào trứng nuôi cấy *in vitro* cho tỷ lệ về phôi và thụ tinh thấp hơn so với tế bào trứng nuôi cấy *in vivo* (Trounson và

ctv, 2001; Kala và ctv, 2017). Bên cạnh đó, quy trình IVM thường quy ưu tiên sử dụng các tế bào trứng thu từ nang noãn trung bình (MF; 3-7mm), một lượng lớn vật liệu di truyền từ các nang noãn nhỏ (SF; <3mm) thường bị loại bỏ do tỷ lệ thành thực và khả năng phát triển phôi thấp (Marchal và ctv, 2002; Kohata và ctv, 2013). Vì vậy, nhiều nghiên cứu đã và đang nỗ lực tìm ra các giải pháp để cải thiện môi trường nuôi cấy *in vitro*, không chỉ nhằm nâng cao hiệu quả sản xuất phôi *in vitro* (Nguyen và ctv, 2010; Kere và ctv, 2014) mà còn đảm bảo được chất lượng và khả năng sống sót của tế bào trứng thu từ SF (Valadao và ctv, 2020). Hiện nay, có rất nhiều phương pháp để tối ưu hóa quy trình nuôi cấy *in vitro*, trong đó có protein là yếu tố tăng trưởng nội mao mạch (VEGF: vascular endothelial growth factor). Sự hiện diện của VEGF đã được chứng minh là có ích đối với quá trình phát triển nang noãn (Yang và Fortune, 2007), sự rụng trứng và phát triển của phôi (Biswas và ctv, 2018). Ngoài ra, VEGF là một protein có ảnh hưởng tích cực đến việc nuôi cấy tế bào trứng, tỷ lệ thành thực về nhân và tế bào chất cũng được cải thiện đáng kể khi bổ sung VEGF vào môi trường nuôi cấy ở tế bào trứng heo (Biswas và Huyn, 2011; Kere và ctv, 2014; Bui và ctv, 2016; Biswas và ctv 2018), bò (Einspanier và ctv, 2002; Lou và ctv, 2002; Anchodorquy và ctv, 2015), cừu (Cao và ctv, 2009) và chuột (Shimizu và ctv, 2007). Nghiên cứu gần đây của chúng tôi cũng chỉ ra rằng việc bổ sung VEGF ở mức 250 ng/ml giúp cải thiện khả năng hồi phục giảm phân và phát triển phôi heo đơn tính từ nguồn tế bào trứng thu từ nang noãn nhỏ (Nguyễn Thanh Ngân và Nguyễn Ngọc Tấn, 2023). Vì vậy, nghiên cứu này nhằm xác định ảnh hưởng của VEGF bổ sung theo từng giai đoạn nuôi cấy IVM đến tỷ lệ thành thực nhân và khả năng phát triển sau kích hoạt của phôi đơn tính ở tế bào trứng heo thu từ nang noãn nhỏ.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu, địa điểm và thời gian

Buồng trứng heo được thu nhận tại lò mổ địa phương. Tất cả các hóa chất được sử dụng

trong nghiên cứu này được nhập từ Sigma - Aldrich (Hoa Kỳ), ngoại trừ những hóa chất đặc biệt sẽ được chỉ ra trong bài viết.

Nghiên cứu này được thực hiện tại Phòng Công nghệ Phôi Động vật, Viện Nghiên cứu Công nghệ Sinh học-Môi trường và Khoa Khoa học Sinh học, Trường Đại học Nông Lâm Tp. Hồ Chí Minh, từ tháng 4/2022 đến tháng 11/2022.

2.2. Phương pháp

2.2.1. Thu nhận phức hợp tế bào trứng

Phương pháp thu nhận COC được thực hiện theo quy trình của Nguyễn Ngọc Tấn và ctv (2019a,b). Các nang noãn có kích thước nhỏ và trung bình được chọc hút lần lượt bằng đầu kim 20G và 18G gắn vào syringe 5ml và 10ml.

2.2.2. Nuôi cấy thành thực tế bào trứng

Sau khi thu tế bào trứng từ các nang noãn có kích thước khác nhau, các phức hợp tế bào trứng có từ 2 lớp tế bào cumulus được chọn lựa và đưa vào nuôi cấy trong môi trường nuôi cấy thành thực tế bào trứng là TCM-199 có bổ sung 10% dịch nang noãn, 0,8% BSA (Bovine Serum Albumin), 100 UI/ml Penicillin G sodium salt và 100 UI/ml Streptomycin sulfate salt trong 44 giờ ở điều kiện 39°C, 5% CO₂. Bổ sung 10 UI/ml hCG (human Chorionic Gonadotropin) cho môi trường nuôi cấy trong 22 giờ đầu và không bổ sung hormone cho môi trường nuôi cấy trong 22 giờ sau (Nguyễn Ngọc Tấn và ctv, 2019a,b).

2.2.3 Phương pháp kích hoạt và nuôi cấy phôi đơn tính

Sau 44 giờ nuôi cấy IVM, tế bào trứng được loại bỏ lớp cumulus và chỉ những tế bào trứng có xuất hiện thể cực thứ nhất (tế bào trứng thành thực) được sử dụng để kích hoạt với 7% ethanol trong 5 phút (Francisco và ctv, 2021), sau đó ủ 4 giờ với 2,5µM 6-DMAP (Nguyen và ctv, 2010).

Sau khi ủ với 6-DMAP, tế bào trứng được rửa 3 lần và đưa vào nuôi cấy 168 giờ dưới dạng vi giọt (100µl) trong môi trường nuôi phôi (Porcine Zygote Medium-PZM3). Tỷ lệ phân chia tế bào (≥ 2 tế bào) sau 24 giờ nuôi

trong PZM3 được ghi nhận và sự hình thành phôi nang được quan sát sau 168 giờ nuôi trong PZM3 dưới kính hiển vi đảo ngược (Nguyễn Thanh Ngân và Nguyễn Ngọc Tấn, 2023).

2.2.4. Đánh giá sự thành thực nhân bằng phương pháp Aceto-Orcein

Sau 44 giờ nuôi cấy, COC được loại bỏ tế bào cumulus, sau đó cố định mẫu và nhuộm Aceto-Orcein theo quy trình của Nguyễn Ngọc Tấn và ctv (2019b). Tế bào trứng đã nhuộm được quan sát hình thái nhân dưới kính hiển vi, nhận diện trạng thái nhân ở các giai đoạn điển hình như sau Túi mầm (GV): nhiễm sắc thể tồn tại trong màng nhân và không có dấu hiệu vỡ ra, quan sát được hình vòng nhẫn; Metaphase I: nhiễm sắc thể đồng dạng sắp xếp trên mặt phẳng xích đạo của thoi vô sắc ở giai đoạn gian kỳ của giảm phân I; Metaphase II: nhiễm sắc thể đồng dạng sắp xếp trên mặt phẳng xích đạo của thoi vô sắc ở giai đoạn gian kỳ của giảm phân II và xuất hiện thể cực thứ nhất; Thoái hóa (Degenerated): nhiễm sắc thể duỗi xoắn, đứt gãy, tế bào chất bị biến dạng. Tế bào trứng được đánh giá thành thực nhân khi quan sát thấy nhiễm sắc thể ở giai đoạn MII.

2.3. Nội dung thực hiện

2.3.1. Đánh giá ảnh hưởng của thời điểm bổ sung VEGF trong nuôi cấy IVM đến tỷ lệ thành thực nhân của tế bào trứng heo thu từ nang noãn nhỏ

COC được nuôi cấy bổ sung VEGF với nồng độ 250 ng/ml ở các giai đoạn khác nhau của IVM. Các phức hợp COC thu từ SF và MF nuôi không bổ sung VEGF được xem là đối chứng. COC thu từ nang noãn nhỏ bổ sung ở 22 giờ nuôi cấy IVM đầu tiên và không VEGF ở 22 giờ sau; không bổ sung VEGF ở 22 giờ đầu và có ở 22 giờ sau; bổ sung VEGF suốt 44 giờ nuôi cấy IVM ở SF. Đánh giá dựa vào tỷ lệ thành thực nhân bằng nhuộm Aceto-Orcein, thí nghiệm này được lặp lại 6 lần.

2.3.2. Đánh giá ảnh hưởng của thời điểm bổ sung VEGF trong nuôi cấy IVM đến khả năng phát triển sau khi kích hoạt phôi đơn tính của tế bào trứng heo thu từ nang noãn nhỏ

COC sau khi được thu nhận từ SF và MF được nuôi cấy theo nghiệm thức như nội dung 1. Sau IVM, các tế bào trứng thành thực được kích hoạt phôi đơn tính bằng ethanol và đánh giá dựa vào tỷ lệ phân chia tế bào ở thời điểm 24 giờ và hình thành phôi nang sau 168 giờ nuôi trong PZM3, thí nghiệm này được lặp lại 6 lần.

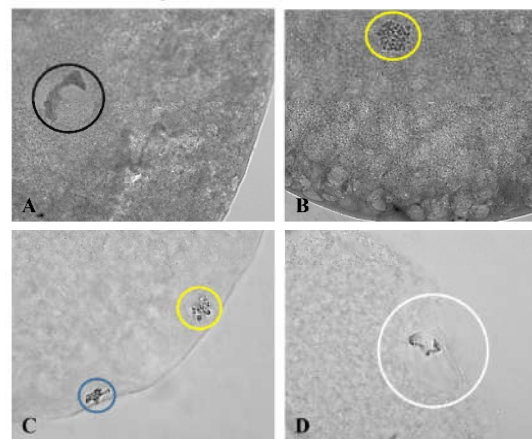
2.4. Xử lý số liệu

Số liệu được xử lý theo phương pháp thống kê mô tả và phân tích phương sai một yếu tố (ANOVA). Các số liệu được trình bày dưới dạng Mean±SEM. Các giá trị % được chuyển về dạng arcsin trước khi phân tích ANOVA.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Đánh giá ảnh hưởng của thời điểm bổ sung VEGF trong nuôi cấy IVM đến tỷ lệ thành thực nhân của tế bào trứng heo thu từ nang noãn nhỏ

Sau 44 giờ nuôi cấy, tế bào trứng được nhuộm bằng Aceto-Orcein và được quan sát dưới kính hiển vi để phân loại dựa vào hình thái nhân tế bào, kết quả hình ảnh đại diện cho các giai đoạn của nhân được trình bày ở hình 1 và bảng 1.



Hình 1. Hình ảnh đại diện các tế bào trứng ở các giai đoạn khác nhau của nhân sau khi nhuộm Aceto-Orcein

A: GV (Germinal Vesicle), B: MI (Metaphase I), C: MII (Metaphase II), D: Tế bào trứng thoái hóa (Độ phóng đại 1.000 lần).

Bảng 1. Khả năng thành thực nhân của tế bào trứng theo thời điểm bổ sung VEGF trong nuôi cấy IVM

Nhóm tế bào trứng	Giai đoạn bổ sung VEGF (ng/ml)		Số tế bào trứng nuôi cấy (n)	Tỷ lệ các tế bào trứng đạt đến các giai đoạn khác nhau của nhân (%)			
	22 giờ đầu	22 giờ sau		n (GV/GVBD)	n (MI)	n (MII)	n (DEG)
MF	0	0	118	9 (7,6±1,1)	10 (8,4±1,6)	88 (74,6±1,8)	10 (8,5±1,1)
SF	0	0	117	14 (11,9±1,6)	30 (25,8±2,3)	53 (45,4±1,4)	17 (17,0±2,0)
SF	0	250	118	12 (10,2±1,9)	21 (17,8 ^{ab} ±2,9)	69 (58,5 ^b ±1,3)	17 (14,4±3,7)
SF	250	0	119	7 (6,8±2,5)	14 (11,8 ^{bc} ±1,7)	88 (73,9 ^a ±1,4)	9 (8,4±1,6)
SF	250	250	118	12 (10,2±1,3)	13 (10,1 ^{bc} ±1,8)	84 (71,2 ^a ±2,4)	10 (8,5±1,7)

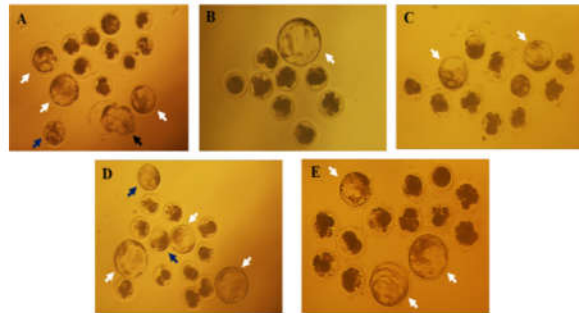
Trong cùng cột, số liệu có các chữ cái khác nhau sai khác có ý nghĩa thống kê ($P<0,05$). Số liệu được lặp lại 6 lần.

Kết quả ở bảng 1 cho thấy rằng khi bổ sung protein VEGF cùng nồng độ nhưng ở các giai đoạn khác nhau đã tác động đến sự thành thực nhân tế bào trứng heo một cách khác biệt có ý nghĩa. Tỷ lệ tế bào trứng đạt đến giai đoạn MII cao nhất (73,9%; $P<0,05$) ở nhóm COC thu từ SF khi nuôi cấy IVM có bổ sung VEGF ở 22 giờ đầu so với nhóm COC thu từ SF được nuôi cấy trong môi trường hoàn toàn không bổ sung VEGF (45,4%), hay chỉ bổ sung trong 22 giờ sau (58,5%) và khác biệt không có ý nghĩa ($P>0,05$) so với việc bổ sung trong suốt 44 giờ nuôi cấy (71,2%). Điều thú vị là khi bổ sung VEGF trong 22 giờ đầu hoặc suốt 44 giờ của IVM đã cải thiện khả năng hồi phục giảm phân ở giai đoạn MI.

Nhiều nghiên cứu cũng chỉ ra rằng, bổ sung VEGF trong môi trường nuôi cấy IVM ở 22 giờ đầu giúp nâng cao đáng kể về tỷ lệ hồi phục giảm phân của tế bào trứng heo thu từ nang noãn nhỏ (Bui và ctv, 2016) và nang noãn trung bình (Kere và ctv, 2014; Nguyễn Thị Ngọc Hân và Nguyễn Ngọc Tấn, 2021).

3.2. Ảnh hưởng của thời điểm bổ sung VEGF trong nuôi cấy IVM đến khả năng phát triển sau khi kích hoạt phôi đơn tính của tế bào trứng heo thu từ nang noãn nhỏ

Kết thúc IVM, tế bào trứng thành thực được kích hoạt tạo phôi đơn tính, kết quả được trình bày ở hình 2 và bảng 2.



Hình 2. Ảnh đại diện về hình thành phôi nang khi bổ sung VEGF (250 ng/ml) ở các giai đoạn nuôi cấy IVM

A: COC thu từ MF nuôi cấy không bổ sung VEGF; B: COC thu từ SF nuôi cấy không bổ sung VEGF; C: COC thu từ SF bổ sung VEGF lúc 22 giờ sau; D: COC thu từ SF bổ sung VEGF lúc 22 giờ đầu; E: COC thu từ SF bổ sung VEGF suốt 44 giờ.

Kết quả bảng 2 cho thấy bổ sung VEGF có xu hướng cải thiện tỷ lệ phân chia tế bào, tức là hoàn thiện quá trình giảm phân và kích hoạt quá trình nguyên phân. Tỷ lệ phôi có 2 tế bào lúc 24 giờ sau kích hoạt cải thiện đáng kể ($P<0,05$) khi bổ sung VEGF ở 22 giờ đầu hay suốt 44 giờ nuôi cấy IVM (74,3 và 70,7%) so với bổ sung 22 giờ sau hay không bổ sung VEGF (61,9 và 60,5%) ở nhóm COC thu từ nang noãn nhỏ. Việc bổ sung VEGF ở

22 giờ sau, 22 giờ đầu và 44 giờ của IVM đạt tỷ lệ phôi nang tương ứng là 13,1%; 28,3% và 24,4%, khác biệt không có ý nghĩa ($P>0,05$) giữa các nhóm nhưng cao có ý nghĩa ($P<0,05$) so với khi không bổ sung VEGF ở nhóm COC thu từ SF (6,5%). Đặc biệt, tỷ lệ phân chia tế

bào và phôi nang khi bổ sung VEGF 22 giờ đầu (lần lượt là 74,3 và 70,7%) và suốt 44 giờ (lần lượt là 28,3 và 24,4%) không khác biệt có ý nghĩa ($P>0,05$) so với nhóm COC thu từ MF khi không bổ sung VEGF (lần lượt là 79,9 và 31,7%).

Bảng 2. Khả năng phát triển sau kích hoạt phôi đơn tính theo thời điểm bổ sung VEGF trong nuôi cấy IVM

Nhóm tế bào trứng	Giai đoạn bổ sung VEGF (ng/ml)		Số tế bào trứng được kích hoạt (n)	Tỷ lệ tế bào trứng phát triển sau khi kích hoạt phôi đơn tính (%)	
	22 giờ đầu	22 giờ sau		n (≥ 2 tế bào)	n (Phôi nang)
MF	0	0	85	67 (79,9 ^a ±2,2)	27 (31,7 ^a ±1,5)
SF	0	0	48	29 (60,5 ^c ±1,3)	3 (6,5 ^c ±2,9)
SF	0	250	68	42 (61,9 ^c ±1,1)	9 (13,1 ^b ±1,8)
SF	250	0	85	63 (74,3 ^{ab} ±1,4)	24 (28,3 ^{ab} ±2,7)
SF	250	250	82	58 (70,7 ^b ±1,7)	20 (24,4 ^{ab} ±1,5)

Kết quả của nghiên cứu này có điểm tương đồng so với các nghiên cứu trước đây (Lou và ctv, 2002; Bui và ctv, 2016). Nghiên cứu của Kere và ctv (2014) cũng báo cáo rằng phôi heo đơn tính đạt kết quả cao nhất khi bổ sung protein VEGF-A trong 22 giờ đầu hay 44 giờ của IVM so với 22 giờ sau và không bổ sung VEGF.

4. KẾT LUẬN

Bổ sung protein VEGF ở mức 250 ng/ml ở giai đoạn 22 giờ đầu hoặc suốt 44 giờ nuôi cấy tế bào trứng không những giúp gia tăng khả năng thành thực nhân mà còn cải thiện đáng kể tỷ lệ hình thành phôi nang của tế bào heo trứng thu từ nang noãn nhỏ.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Anchordoquy J.M., Anchordoquy J.P., Testa J.A., Sirini M.A. and Furnus C.C. (2015). Influence of vascular endothelial growth factor and cysteamine on *in vitro* bovine oocyte maturation and subsequent embryo development. *Cell Biol. Int.*, **39**: 1090-98.
2. Biswas D. and Hyun S.H. (2010). Effect of vascular endothelial growth factor on *in vitro* porcine oocyte maturation and subsequent developmental competence after parthenogenesis. *J. Anim. Vet. Adv.*, **9**: 2924-31.
3. Biswas D. and Hyun S.H. (2011). Supplementation with vascular endothelial growth factor during *in vitro* maturation of porcine cumulus oocyte complexes and subsequent developmental competence after *in vitro* fertilization. *Theriogenol.*, **76**: 153-60.
4. Biswas D, So K.H., Hwang S.U., Yoon J.D., Kim M., Kim D.Y. and Hyun S.H. (2018). Embryotropic effects of

- vascular endothelial growth factor on porcine embryos produced by *in vitro* fertilization. *Theriogenol.*, **120**: 147-56.
5. Bui T.M.T., Nguyen K.X., Karata A., Ferré P., Tran M.T., Wakai T. and Funahashi H. (2016). Presence of vascular endothelial growth factor during the first half of IVM improves the meiotic and developmental competence of porcine oocytes from small follicles. *Rep. Fert. Dev.*, **29**(10): 1902-09.
6. Cao X., Zhou P., Hailing L., Youzhang Z. and Gouqing S. (2009). The effect of VEGF on the temporal-spatial change of alpha-tubulin and cortical granules of ovine oocytes matured *in vitro*. *Anim. Rep. Sci.*, **113**(1-4): 236-50.
7. Einspanier R., Schonfelder M., Muller K., Stojkovic M., Kosmann M., Wolf E. and Schams D. (2002). Expression of the vascular endothelial growth factor and its receptors and effects of VEGF during *in vitro* maturation of bovine cumulus-oocyte complexes (COC). *Mol. Rep. Dev.*, **62**: 29-36.
8. Francisco B., Belén G., Victoria B., Nélida R.O. and Carolina V. (2021). Effect of ethanol on parthenogenetic activation and α -Tocopherol supplementation during *in vitro* maturation on developmental competence of summer-collected bovine oocytes. *Curr. Issues Mol. Biol.*, **43**: 2253-65.
9. Kala M., Shaikh M.V. and Nivsarkar M. (2017). Equilibrium between anti-oxidants and reactive oxygen species: a requisite for oocyte development and maturation. *Rep. Med. Bio.*, **16**: 28-35.
10. Kere M., Siriboon C., Liao J.W., Lo N.W., Chiang H.I., Fan Y.K., Kastelic J.P. and Ju J.C. (2014). Vascular endothelial growth factor A improves quality of matured porcine oocytes and developing parthenotes. *Dom. Anim. Endocrinol.*, **49**: 60-69.
11. Kohata C., Izquierdo-Rico M.J., Romar R. and Funahashi H. (2013). Development competence and

- relative transcript abundance of oocytes derived from small and medium follicles of prepubertal gilts. *Theriogenol.*, **80**: 970-78.
12. Lou H., Kimura K., Aoki M. and Hirako M. (2002). Vascular endothelial growth factor (VEGF) promotes the early development of bovine embryo in the presence of cumulus cells. *J. Vet. Med. Sci.*, **64**(11): 967-71.
 13. Marchal R., Vigneron C., Perreau C., Bali-Papp A. and Mermillod P. (2002). Effect of follicular size on meiotic and developmental competence of porcine oocytes. *Theriogenol.*, **57**: 1523-32.
 14. Nguyen N.T., Lin D.P.C., Siriboon C., Lo N.W. and Ju J.C. (2010). Sonic hedgehog improves *in vitro* development of porcine parthenotes and handmade cloned embryos. *Theriogenol.*, **74**: 1149-60.
 15. Nguyễn Ngọc Tấn, Trần Hồ Ái Ngân và Phan Hữu Hương Trinh (2019a). Ảnh hưởng của tỷ lệ tinh trùng trên tế bào trứng đến thụ tinh đa tinh trùng ở tế bào trứng heo trong thụ tinh vi giọt. *KHKT Chăn nuôi*, **243**: 57-72.
 16. Nguyễn Ngọc Tấn, Trần Hồ Ái Ngân, Phạm Thị Ngọc Trúc (2019b). Ảnh hưởng của đồng nuôi cấy phức hợp tế bào trứng heo có chất lượng khác nhau đến khả năng thành thực nhân trong điều kiện *in vitro*. *KHKT Chăn nuôi*, **251**: 65-70.
 17. Nguyễn Thị Ngọc Hân và Nguyễn Ngọc Tấn (2020). Ảnh hưởng của việc bổ sung VEGF đến sự thành thực nhân của tế bào trứng heo. *Tạp chí KHKT Chăn nuôi*, **263**: 2-7.
 18. Nguyễn Thanh Ngân và Nguyễn Ngọc Tấn (2023). Ảnh hưởng của bổ sung yếu tố tăng trưởng nội mạc mạch đến khả năng thành thực nhân và sự phát triển của phôi đơn tính ở heo thu từ nang noãn nhỏ. *Tạp chí KHKT Chăn nuôi*, **284**: 13-17.
 19. Trounson A., Anderiesz C., Jones G. (2001). Maturation of human oocytes *in vitro* and their developmental competence. *Rep.*, **121**: 51-75.
 20. Shimizu T., Iijima K., Miyabayashi K., Ogawa Y., Miyazaki H., Sasada H. and Sato E. (2007). Effect of direct ovarian injection of vascular endothelial growth factor gene fragments on follicular development in immature female rats. *Rep.*, **134**: 677-82.
 21. Valadao L., Silva H., Kajabova S. and Moreira da Silva F. (2020). *In Vitro* Production of Porcine Embryos: A Descriptive Approach, Limitations and Applications. *Biomed. J. Sci. Tech. Res.*, **26**(2): 19876-81.
 22. Yang M.Y. and Fortune J.E. (2007). Vascular endothelial growth factor stimulates the primary to secondary follicle transition in bovine follicles *in vitro*. *Mol. Rep. Dev.*, **74**: 1095-04.

KHẢ NĂNG SẢN XUẤT GÀ HẮC PHONG THỂ HỆ XUẤT PHÁT

Nguyễn Thị Thủy Tiên¹, Hoàng Tuấn Thành^{1*}, Bùi Thị Phượng² và Nguyễn Thị Lan Anh²

Ngày nhận bài báo: 30/11/2022 - Ngày nhận bài phản biện: 11/12/2022

Ngày bài báo được chấp nhận đăng: 30/12/2022

TÓM TẮT

Nghiên cứu nhằm đánh giá khả năng sản xuất của gà Hắc Phong thể hệ xuất phát nuôi tại Trại thực nghiệm Phân viện Chăn nuôi Nam Bộ. Kết quả cho thấy giai đoạn 0-8 tuần tuổi, tỷ lệ sống giữa nhóm dòng trống và dòng mái đạt 95,60 và 95,70% và 9-20 tuần tuổi là 98,00 và 98,40%. Khối lượng 01 ngày tuổi là 28,5 g/con đối với dòng trống và 27,8 g/con đối với dòng mái. Đến 8 tuần tuổi, dòng trống đạt 636,4 g/con trống và 528,4 g/con mái; dòng mái là 633,4 g/con trống và 528,4 g/con mái. Ở 19 tuần tuổi, tương ứng là (1.248,0 g/con trống; 1.032,0 g/con mái) và 1.210,0 g/con trống; 953,5 g/con mái. Lượng thức ăn tiêu thụ cho dòng trống và mái giai đoạn 0-8 tuần tuổi là 1.706,0 g/con và 1.682,0 g/con; giai đoạn 9-20 tuần tuổi là 5.830,0 g/con trống; 5.283,0 g/con mái và 5.764,0 g/con trống; 5.219,0 g/con mái tương ứng cho mỗi nhóm. Tuổi đẻ dao động 136-138 ngày. Năng suất trứng đạt 147,50-147,70 quả/mái/72 tuần tuổi, tương ứng với tỷ lệ đẻ trung bình là 40,30-40,60% và tiêu tốn thức ăn là 2,49 kg/10 quả trứng. Khối lượng trứng 38 tuần tuổi đạt 42,20-42,50 g/quả. Một số chỉ tiêu ấp nở đạt được như sau: tỷ lệ trứng có phôi/trứng ấp là 94,50-94,70%, tỷ lệ nở/trứng ấp là 83,30-84,40%, tỷ lệ nở/trứng có phôi 88,10-89,10%, tỷ lệ gà loại 1/trứng ấp là 75,40-78,50%.

Từ khóa: Chọn lọc, gà Hắc Phong, khả năng sản xuất, chất lượng trứng.

ABSTRACT

Evaluation of the productive performance of the first generation of Hac Phong chicken breed

¹ Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển Chăn nuôi Gia cầm Vigova

² Phân viện Chăn nuôi Nam bộ.

* Tác giả liên hệ: TS. Hoàng Tuấn Thành, Trung tâm Nghiên cứu và Phát triển Chăn nuôi Gia cầm Vigova. Địa chỉ: 496/101 Dương Quang Hàm, Phường 6, Gò Vấp, TP.HCM. Điện thoại: 0903 355003; Email: thanhvigova@yahoo.com.