

ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG PHÁT TRIỂN *IN VITRO* CỦA PHÔI BÒ *IN VITRO* SAU CHIA PHÔI

Nguyễn Khánh Vân, Quấn Xuân Hữu, Vũ Thị Thu Hương
Nguyễn Thị Hương và Nguyễn Thị Lệ Hương

Phòng TNTĐ – CNTBDV - Viện Chăn nuôi;

Tác giả liên hệ: Nguyễn Khánh Vân. Email: Cotihin@gmail.com

ABSTRACT

Development potential of *in vitro* bovine embryos after splitting.

The purpose of this study was evaluated development potential of *in vitro* bovine embryos after splitting. In this study we used *in vitro* bovine embryo at compact morula, early blastocysts, blastocysts stages and A, B grade. The results obtained showed two intact emryos can produced from on embryo by splitting technique with a succes rate of 92.66% (ranged from 90.3% to 95.31%). Embryonic stage of development had no effect on a succes rate of splitting ($P > 0.05$). Further *in vitro* development of *in vitro* embryos after splitting was not affected by developmental stages of embryos. Further *in vitro* development rate of *in vitro* embryos after splitting for embryo at compact morulae, early blastocysts and blastocysts stages was 33.33; 30.51% and 28.26%, respectively ($P > 0.05$). In conclusion, bovine embryos at compact morula, early blastocysts, blastocysts stages all can be split in two succesfully.

Keywords: *in vitro* bovine embryo, spliting embryo, *in vitro* development

ĐẶT VẤN ĐỀ

Kỹ thuật cắt phôi đã được ứng dụng trong điều kiện thí nghiệm và đã được thương mại hóa, tỷ lệ có chứa của phôi cắt chỉ thấp hơn từ 5-10% so với phôi không cắt (Williams và cs., 1984; Baker và Shea, 1985; Takeda và cs., 1986; Gray và cs., 1991; Kippax và cs., 1991); thậm chí là tương đương so với phôi không cắt (Holm và cs., 1991). Tỷ lệ có chứa của nửa phôi sau cắt hiện nay dao động từ 30-50% phụ thuộc vào nhiều yếu tố (Kanagawa và cs., 1995). Khả năng phát triển của phôi động vật nuôi ở giai đoạn sớm sau khi cắt thành hai nửa đã được chứng minh ở trên cừu (Willadsen, 1979). Kể từ đó kỹ thuật này đã được sử dụng cho phôi ở giai đoạn muộn và ứng dụng rộng rãi ở một số loài: bò (Ozil, 1983); ngựa (Allen và Pashen, 1984), dê (Tsunoda và cs., 1985); cừu (Willadsen và Godke, 1984) và lợn (Rorie và cs., 1985). Willadsen và cs. (1979) đã sử dụng phương pháp cắt phôi ở giai đoạn chưa biệt hóa (2-4 tế bào). Theo tác giả thì mỗi phôi bào đều có thể phát triển như một phôi bình thường. Sau đó có nhiều tác giả đã nghiên cứu cắt phôi ở giai đoạn muộn hơn và đã tạo được bê sinh đôi từ một phôi cắt đôi từ giai đoạn dâu, phôi nang sớm hoặc phôi nang. Kỹ thuật cắt phôi ngày càng phát triển cao hơn như từ một phôi cắt làm 4 hoặc từ một phôi 8 tế bào tách thành 8 phôi. Đến nay, trên thế giới hàng năm có hàng trăm bê sinh ra từ những phôi chia hai.

Ý nghĩa của việc cắt phôi trong cấy truyền phôi bò là tạo ra một lượng lớn bê và các cặp bê được sinh ra từ một phôi ban đầu. Việc tăng số lượng phôi từ một phôi ban đầu, giúp cho người chăn nuôi có nhiều bê hơn, đặc biệt là tạo ra những bê giống nhau hoàn toàn về mặt kiểu hình cũng như di truyền. Việc tạo ra nhiều bê giống nhau về cấu trúc di truyền rất hữu ích trong mô hình đánh giá biểu hiện của một tính trạng nào đó là do yếu tố di truyền hay do yếu tố môi trường. Ngoài ra, cắt phôi còn giúp cho việc phát triển các vấn đề nghiên cứu cơ bản khác như cắt, chia phôi và nhân phôi từ tế bào đơn, ghép phôi, xác định giới tính từ giai đoạn phôi.

Tại Việt Nam, kỹ thuật cắt phôi lần đầu tiên được nghiên cứu tại Viện Chăn nuôi. Ngày 3/3/2002, một cặp bê cái sinh đôi từ một phôi bò *in vivo* cắt đôi đã ra đời. Tuy nhiên, hiệu quả của kỹ thuật cắt, đánh giá khả năng sống *in vitro* tiếp theo của hai nửa phôi bò được tạo ra từ một phôi *in vitro* đến

nay vẫn chưa được báo cáo. Việc nuôi và đánh giá khả năng phát triển *in vitro* tiếp theo của phôi *in vitro* sau cắt sẽ loại trừ được những phôi không có khả năng sống sau cắt mà vẫn được cấy truyền vào con nhận. Mục đích của nghiên cứu này là đánh giá được khả năng phát triển *in vitro* của hai nửa phôi bò được tạo ra từ một phôi bò *in vitro* bằng kỹ thuật cắt phôi.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Vật liệu nghiên cứu

Sử dụng phôi bò *in vitro* loại A, B phát triển đúng giai đoạn tại thời điểm thu phôi cho các thí nghiệm của nghiên cứu này. Phôi loại A, B là phôi có hình dáng phôi tròn và có màng sáng nguyên vẹn. Khối tế bào phân chia rõ, mỗi liên kết phôi bào của mầm phôi chặt chẽ. Nếu là phôi nang, hoặc nang sớm có xoang nang rõ ràng, điển hình, toàn bộ phôi màu sáng.

Phương pháp nghiên cứu

Kỹ thuật cắt phôi

Kỹ thuật cắt phôi được thực hiện theo phương pháp của Willams và cs. (1983). Phôi sẽ được cắt đôi theo kỹ thuật “trầy xước”. Kỹ thuật này có liên quan đến việc tạo ra các vết xước tại vị trí cắt phôi song song với định hướng của dao cắt dưới đĩa để tránh hiện tượng phôi bị trượt trong quá trình cắt. Phương pháp này được thực hiện theo các bước như sau:

Bước 1: Chuẩn bị môi trường lưu phôi: DPBS + Huyết thanh thai bê + kháng sinh (tỷ lệ DPBS (ml) : huyết thanh thai bê (ml) : kháng sinh (μ l) = 4 : 1 : 5). Cách pha kháng sinh: lấy 5ml DPBS cho vào lọ Penicillin 1.000.000 iu, 5ml DPBS cho vào lọ Streptomycin 1g/l; sau khi lắc đều cho tan hết Penicillin và Streptomycin ở cả 2 lọ lấy 5ml dung dịch Streptomycin cho vào 5ml dung dịch Penicillin ta được 10ml hỗn hợp kháng sinh với nồng độ Penicillin 100.000 iu/ml, Streptomycin 0,1 g/ml. Môi trường cắt phôi: DPBS + huyết thanh thai bê (tỷ lệ DPBS (ml) : huyết thanh thai bê (ml) = 4 : 1), môi trường nuôi phôi *in vitro* sau khi cắt là môi trường mCR1aa.

Bước 2: Chuẩn bị đĩa Petri nhựa sử dụng cho quá trình cắt phôi, tạo các vết xước song song trên đĩa để tránh hiện tượng phôi bị trượt trong quá trình cắt. Cho môi trường cắt phôi vào trong đĩa (200 μ l môi trường chia phôi/đĩa). Đưa đĩa cắt phôi lên trên kính hiển vi thao tác với chế độ làm ấm tự động, nhiệt độ làm ấm là 37°C.

Bước 3: Lắp hệ thống dao cắt vi phẫu thuật vào kính hiển vi, mũi dao phải thẳng góc với đáy đĩa Petri chứa phôi để cắt.

Bước 4: Chuyển phôi nhẹ nhàng từ đĩa có chứa môi trường lưu phôi vào đĩa cắt phôi tại vị trí cắt (vị trí tạo vết xước song song), chờ cho phôi cố định, chỉnh kính hiển vi, di chuyển bộ phận dao cắt xuống gần với phôi và tăng dần độ phóng đại của kính hiển vi.

Bước 5: Hạ thấp từ từ lưỡi dao cắt vào đúng giữa khối tế bào phôi, phôi đầu muộn được cắt thông qua trục trung tâm của phôi, trong khi đó nếu là cắt phôi nang phải cân đối để chia $\frac{1}{2}$ lá nuôi, đĩa phôi cho mỗi nửa phôi. Cho dao thấp hướng tới đáy của đĩa sau đó chạm tới đáy đĩa cắt phôi, điều khiển lưỡi dao nhanh và dứt khoát. Nhờ đó phôi sẽ được cắt bởi một chuyển động thẳng đứng. Thời gian cắt càng nhanh càng tốt, khoảng từ 1-2 phút/phôi.

Nuôi phôi *in vitro* sau cắt

Phôi sau cắt được để nguyên trong màng sáng và chuyển sang môi trường nuôi phôi *in vitro* sau cắt. Chỉ hai nửa phôi còn nguyên vẹn từ một phôi ban đầu mới được chuyển vào giọt nuôi có phủ dầu

khoảng với lượng thể tích môi trường nuôi phôi là 10 μ l/giọt, và được nuôi ở 5% CO₂, ở 38,5°C, độ ẩm không khí bão hòa. Sau 24h nuôi đánh giá sự phát triển, hình thái và chất lượng của phôi. Khả năng sống của phôi bò *in vitro* sau cắt được đánh giá dựa trên sự quan sát hình thái. Các nửa phôi được cho là có khả năng sống nếu chúng phát triển đến giai đoạn tiếp theo.

Phân tích số liệu

Số liệu được xử lý bằng phần mềm Excell, kiểm tra sự khác nhau có ý nghĩa bằng χ^2 sử dụng hàm CHITEST, sự sai khác có ý nghĩa với $P < 0,05$.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Kết quả cắt phôi

Thu được tổng số 372 phôi *in vitro* từ 579 tế bào trứng loại A, B có nguồn gốc từ buồng trứng bò ở lò mổ. Trong số này có 184 phôi *in vitro* loại A, B phát triển đúng giai đoạn tại thời điểm thu phôi (53 phôi dâu muộn, 64 phôi nang sớm và 67 phôi nang) được dùng cho các thí nghiệm.

Tỷ lệ nửa phôi thực tế sau cắt so với số lượng phôi thu được sau cắt theo lý thuyết đối với cả ba loại phôi dâu muộn, phôi nang sớm và phôi nang là 92,66% (Bảng 1); trong đó cao nhất là ở phôi cắt giai đoạn nang sớm nhưng không có sự sai khác giữa phôi dâu muộn, phôi nang sớm và phôi nang (tương ứng là 92,45%; 95,31% và 90,3%; $P > 0,05$). Tỷ lệ này đối với phôi dâu muộn của chúng tôi là thấp hơn so với Saito và cs. (1993), nhưng lại cao hơn đối với phôi nang sớm và phôi nang. Theo các tác giả này từ 105 phôi dâu muộn, phôi nang sớm hoặc phôi nang *in vivo*, sau cắt thu được 199 nửa phôi nguyên vẹn, tỷ lệ nửa phôi nguyên vẹn thu được sau cắt đạt 94,76%; trong đó ở phôi dâu muộn là 97,96% (96/98), phôi nang sớm và nang giãn nở là 87,29% (103/118).

Bảng 1. Hiệu quả của kỹ thuật cắt phôi

Loại phôi	Phôi cắt (n)	Nửa phôi theo lý thuyết (n)	Nửa phôi thực tế (n, % $\pm$ SE)
Phôi dâu muộn	53	106	98 92,45 ^a $\pm$ 2,59
Phôi nang sớm	64	128	122 95,31 ^a $\pm$ 2,62
Phôi nang	67	134	121 90,3 ^a $\pm$ 1,71
Tổng số	184	368	341 92,66 $\pm$ 1,43

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

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy việc tạo phôi cắt từ phôi ở ba giai đoạn phôi dâu muộn, phôi nang sớm và phôi nang không bị ảnh hưởng bởi kỹ thuật cắt. Việc cắt phôi ở các giai đoạn này là thích hợp. Nguyên nhân là do lúc đó khối tế bào phôi đã đủ lớn nhưng chưa biệt hóa nên kết quả tốt hơn, nếu phôi ở giai đoạn muộn hơn tế bào phôi đã hình thành các lá phôi thì xác suất để cho một

cơ thể trọn vẹn là thấp. Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng kỹ thuật tạo các vết xước song song nhằm nâng cao được hiệu quả của kỹ thuật cắt phôi, tăng tỷ lệ nửa phôi còn sau cắt. Theo Goto và cs. (1988), tỷ lệ phôi nang có hai nửa sau cắt ở kỹ thuật cắt không tạo vết xước là 67%, trong khi đó tỷ lệ này ở kỹ thuật cắt tạo vết xước là 94%.

Khả năng phát triển *in vitro* tiếp theo của hai nửa phôi được tạo ra từ phôi bò *in vitro* bằng kỹ thuật cắt phôi

Tỷ lệ phôi bò *in vitro* có hai nửa phôi cùng phát triển đối với cả ba loại phôi dâu muộn, phôi nang sớm và phôi nang trong nghiên cứu của chúng tôi là 30,86% (Bảng 2).

Bảng 2. Khả năng phát triển *in vitro* tiếp theo của hai nửa phôi được tạo ra từ một phôi bò *in vitro* bằng kỹ thuật cắt phôi

Loại phôi	Phôi cắt (n)	Phôi có 2 nửa phôi sau cắt (n)	Phôi có 2 nửa cùng phát triển (n, % ± SE)	Phôi có 1 nửa hoặc cả 2 nửa không phát triển (n, % ± SE)
Phôi dâu muộn	53	46	13 28,26 ^a ± 4,89	33 71,74 ± 4,89
Phôi nang sớm	64	57	19 33,33 ^a ± 4,85	38 66,67 ± 4,85
Phôi nang	67	59	18 30,51 ^a ± 3,15	41 69,49 ± 3,15
Tổng số	184	162	50 30,86 ± 1,5	112 69,14 ± 1,5

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

Mặc dù phôi cắt ở giai đoạn phôi nang sớm cho tỷ lệ sống sau cắt (33,33%) là cao hơn so với phôi dâu muộn và phôi nang (tương ứng là 28,26% và 30,51%) nhưng sai khác không có ý nghĩa ($P > 0,05$).

Tỷ lệ hai nửa phôi được cắt từ một phôi ban đầu có khả năng phát triển *in vitro* tiếp theo trong nghiên cứu của chúng tôi là thấp hơn rất nhiều so với báo cáo của Tao và cs. (1995) khi nghiên cứu trên phôi lợn. Theo họ, tỷ lệ cả hai nửa phôi lợn cắt từ một phôi *in vivo* ban đầu được nuôi *in vitro* 24h phát triển đến giai đoạn có khả năng cấy truyền đạt 61,6%, và tỷ lệ này tương ứng đối với phôi dâu, nang sớm và nang tương ứng là 55,4%; 64,5% và 74,3%, $P < 0,05$. Cũng theo các tác giả này sự có mặt của khối tế bào nội bào (Inner cell mass – ICM) làm tăng chất lượng của phôi nang sớm hoặc phôi nang sau cắt hơn so với phôi dâu. Kết quả nghiên cứu của họ chỉ ra rằng cắt phôi ở giai đoạn phôi nang là thích hợp nhất, cắt phôi ở giai đoạn phôi nang giúp cho việc phân chia các ICM và lá nuôi phôi thành hai phần bằng nhau dễ hơn so với phôi dâu. Sự khác nhau về các kết quả

nguyên cứu của chúng tôi với các tác giả này có thể là do yếu tố loài, nguồn gốc và chất lượng của phôi (phôi *in vivo* hoặc *in vitro*), điều kiện thí nghiệm của từng phòng thí nghiệm.

Trong nghiên cứu của mình chúng tôi chỉ tiến hành nghiên cứu kỹ thuật cắt phôi *in vitro* và đánh giá khả năng phát triển *in vitro* của các cặp nửa phôi được tạo ra từ một phôi ban đầu với mong muốn là tạo ra được những cặp bê sinh đôi từ kỹ thuật chia tách và cấy truyền phôi. Việc đánh giá được tỷ lệ sống và khả năng phát triển của phôi sau cắt sẽ giúp loại trừ được các phôi không có khả năng phát triển sau cắt, đây là một trong những yếu tố ảnh hưởng đến tỷ lệ có chửa sau cấy truyền phôi cắt.

KẾT LUẬN

Kết quả đạt được trong nghiên cứu của chúng tôi đã khẳng định có thể tạo ra được hai nửa phôi nguyên vẹn có khả năng phát triển *in vitro* tiếp theo từ một phôi bò *in vitro* ban đầu bằng kỹ thuật cắt phôi. Nghiên cứu này là cơ sở cho việc tạo ra những cặp bê sinh đôi từ một phôi ban đầu bằng kỹ thuật cắt và cấy truyền phôi, với mục đích cho nghiên cứu di truyền và nâng cao số lượng bê sinh ra.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Allen W.R.; Pashen R.L. 1984. Production of monozygotic (identical) horse twins by embryo micromanipulation. *Journal of Reproduction and Fertility* 71: 607-613.
- Baker RD and Shea BF. 1985. Commercial splitting of bovine embryos. *Theriogenology* 23 3-12
- Goto . K, Kajihara Y., Koba M., Nakanishi Y. and Ogawa K. 1988. Pregnancy in cattle after transfer of bisected blastocysts obtained from in vitro fertilization of oocytes matured in vitro. *AJAS Vol. 1 (No. 3):* 153-156.
- Gray KR, Bondioli KR. and Betts CL. 1991. The commercial application of embryo splitting in beef cattle. *Theriogenology* 35 45-54
- Holm, P., Greve, T., Bak, A and Schmidt, M. 1991. Bisection of bovine morulae and blastocyst from superovulated Danish dairy cows. *Acta Vet Scand* 32 : 47-53
- Kanagawa H, Shimohira I, Saitoh N. 1995. Manuel of bovine embryo transfer nationallivestock breeding center MAFF, JICA, Japan.
- Kippax I, Christie W. and Rowan TG. 1991. Effects of methods of splitting, stage development and presence or absence of zona pellucida on fetal survival in commercial bovine embryo transfer of bisected embryos *Theriogenology* 35: 25-35
- OzilJ.P. 1983. Production of identical twins by bisection of blastocysts in the cow. *Journal of Reproduction and Fertility* 69: 463-468.
- Rorie R.W., Voelkel S.A., McFarland C.W., Southern L.L., Godke R.A. 1985. Micromanipulation of Day 6 Porcine embryos to produce split-embryo piglets. *Theriogenology* 23: 225.
- Takeda T., Hallowell SV., McCauley AP. and Hasler JF. 1986. Pregnancy rates with intact and split embryos transferred surgically and nonsurgically *Theriogenology* 25 205 (Abstract)
- Tao T., Reichelt B. and Niemann H. 1995. Ratio of inner cell mass and trophoblastic cells in demi-and intact pig embryo. *Journal of Reproduction and Fertility*. 104: 251-258.

- Tsunoda Y., Tokunaga T., Sugie T., Katsumata M. 1985. Production of monozygotic twins following the transfer of bisected embryos in the goat. *Theriogenology* 24: 337-343.
- Willadsen S.M. 1979. A method for culture of micromanipulated sheep embryos and its use to produce monozygotic twins. *Nature* 277: 463-468.
- Willadsen S.M., Godke R.A. 1984. A simple procedure for the production of identical sheep twins. *The Veterinary Record* 114: 240-243.
- Williams, T. J., Elsdon R. P. and Seidel G. E. Jr. 1983. Bisecting bovine embryos: Methods, application, and success rates. *Proc. Ann. Conf. A. I. and E. T. in Beef Cattle*, Denver, CO.
- Williams TJ, Elsdon RP and Seidel GE, Jr. 1984. Pregnancy rates with bisected bovine embryos. *Theriogenology* 22 521-531.

Người phản biện: TS. Phan Lê Sơn và TS. Nguyễn Văn Hạnh

Ngày nhận bài: 15/8/2014

Ngày duyệt đăng: 5/9/2014