

## BẢO QUẢN LẠNH TẾ BÀO TRỨNG BÒ GIAI ĐOẠN TÚI MÀM BẰNG PHƯƠNG PHÁP THỦY TINH HÓA TRONG CỌNG RẠ VÀ VI GIỌT

Nguyễn Thị Thương Huyền<sup>1,2</sup>, Lâm Sơn Bích Trâm<sup>3</sup>, Nguyễn Quốc Đạt<sup>4</sup>,  
Hoàng Nghĩa Sơn<sup>5</sup>, Phan Kim Ngọc<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Đại học Khoa học tự nhiên tp. Hồ Chí Minh, \* thuonghuyen78@yahoo.com

<sup>2</sup>Trường Đại học Sư phạm tp. Hồ Chí Minh

<sup>3</sup>Bệnh viện Phụ sản Hùng Vương tp. Hồ Chí Minh

<sup>4</sup>Viện Chăn nuôi Quốc gia

<sup>5</sup>Viện Sinh học nhiệt đới, Viện Hàn lâm KH & CN Việt Nam

**TÓM TẮT:** Đề tài tiến hành nhằm đánh giá việc nuôi chín *in vitro* và tạo phôi bằng kỹ thuật thụ tinh trong ống nghiệm (TTTON) từ nguồn tế bào trứng (TBT) bò giai đoạn túi mầm (GV) sau khi được bảo quản lạnh bằng phương pháp thủy tinh hóa trong cọng rạ và trong vi giọt. Chọn các TBT có từ 3 lớp cumulus trở lên và đồng nhất về tế bào chất đem bảo quản lạnh qua 2 bước: TBT được cân bằng trong dung dịch cân bằng 45 giây, chuyển qua dung dịch thủy tinh hóa 25 giây, sau cùng nạp các TBT vào cọng rạ hoặc tạo các vi giọt, chuyển các cọng rạ và vi giọt chứa TBT vào bình nitơ lỏng trong vòng 30 giây. Giải đông TBT qua 3 bước: môi trường rã đông thứ nhất trong 1,5 phút, môi trường rã đông thứ hai khoảng 1,5 phút và môi trường rã đông thứ ba trong 5 phút. Quá trình giải đông tiến hành ở 25-28°C. Đánh giá tỷ lệ sống chết theo quan sát hình thái, sau đó một số được đánh giá theo phương pháp nhuộm AO/PI, số còn lại được nuôi chín *in vitro* trong môi trường 1 và 2 ở 38,5°C, 5% CO<sub>2</sub> trong 20-24 giờ. Chọn các TBT chín đem TTTON. Kết quả xét theo thứ tự từ nguồn cọng rạ và vi giọt lần lượt như sau: tỷ lệ sống theo hình thái đạt 68,52±1,19% và 73,53±1,17% (p<0,05), tỷ lệ sống theo phương pháp nhuộm AO/PI đạt 52,69±3,66% và 48,33±3,72% (p>0,05), tỷ lệ chín đạt 20,79±1,38% và 12,79±1,13% (p<0,05); tỷ lệ thụ tinh (phôi 2 tế bào) đạt 15,64±2,72% và 12,61±3,15%; chỉ có 2/28 phôi phát triển đến giai đoạn phôi nang (từ cọng rạ).

*Từ khóa:* Bảo quản lạnh, giai đoạn túi mầm, tế bào trứng chín, thụ tinh trong ống nghiệm.

### MỞ ĐẦU

Kỹ thuật bảo quản lạnh tế bào trứng (TBT) thường gặp khó khăn do sự hình thành tinh thể đá, điều này có thể khắc phục được phần nào khi sử dụng phương pháp thủy tinh hóa với tốc độ làm lạnh cực nhanh [9]. Đông lạnh TBT chín thường gây tổn thương thoi vô sắc của TBT và kết quả là đứt gãy nhiễm sắc thể, vi ống, vi mao. Điều này hạn chế khả năng sống và phát triển của TBT sau giải đông. Ngược lại, ở TBT giai đoạn túi mầm (TBT GV) chưa có tổ chức thoi vô sắc tham gia vào quá trình giảm phân, vì vậy, bảo quản lạnh TBT ở giai đoạn này là một giải pháp thay thế. Tuy nhiên, tỷ lệ chín khi nuôi cấy từ nguồn TBT GV sau đông lạnh chưa cao [4, 9, 12]. Bên cạnh đó, vật mang cũng đóng vai trò quan trọng trong kết quả đông lạnh. Có nhiều nghiên cứu trước đây đã thành công khi sử dụng cọng rạ làm vật mang, nhưng sử dụng vi giọt chỉ mới có ít nghiên cứu được công bố [7, 9, 13].

Nghiên cứu này được tiến hành nhằm đánh giá khả năng nuôi chín *in vitro* và tạo phôi bằng kỹ thuật thụ tinh trong ống nghiệm (TTTON) từ nguồn TBT GV sau khi bảo quản lạnh bằng phương pháp thủy tinh hóa trong cọng rạ và vi giọt.

### VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

#### Các hóa chất sử dụng trong nghiên cứu

TCM-199 (M3769, Sigma), FBS (Gibco), FCS (Gibco), DMSO (Sigma), EG (Sigma), AO/PI (Sigma), dầu khoáng (Merck), Natri pyruvate (Sigma).

#### Thu nhận tế bào trứng

TBT được thu nhận bằng phương pháp chọc hút từ các nang có đường kính từ 3-8 mm bằng đầu kim 18G. Các TBT có từ 3 lớp tế bào cumulus dày bao quanh, gọi là TBT giai đoạn túi mầm (TBT GV) được chọn để bảo quản lạnh.

#### Đông lạnh và giải đông

*Đông lạnh bằng cọng rạ*

Các TBT GV được chọn đem đông lạnh theo phương pháp thủy tinh hóa (vitrification) qua 2 bước: TBT được cân bằng trong dung dịch (TCM-199+10% FBS+5% FCS+10% DMSO +10% EG) 45 giây, sau đó chuyển qua dung dịch thủy tinh hóa (TCM-199+10% FBS+5% FCS+20% DMSO+20% EG+0,5M Sucrose) 25 giây; nạp 5-7 TBT vào cọng rạ (straw, 0,25 ml) trong vòng 30 giây; cuối cùng chuyển các cọng rạ chứa TBT vào bình nitơ lỏng bảo quản [4, 9].

#### *Đông lạnh bằng vi giọt*

Qui trình tương tự như đông lạnh bằng cọng rạ, dùng pipette Pasteur hút khoảng 2-5  $\mu$ l tạo vi giọt có chứa 5-7 TBT GV nhỏ trực tiếp vào thuyền giấy ngập nitơ lỏng trong hộp xốp khoảng 25 giây. Lần lượt tạo vi giọt đông lạnh tất cả các TBT có được, sau đó dùng kẹp tìm và gắp các vi giọt cho vào ống trữ lạnh (cryotube). Dùng bông nhét kín miệng ống trữ lạnh và nhanh chóng chuyển vào bình chứa nitơ lỏng để bảo quản [4, 9].

#### *Giải đông TBT GV*

Lấy vật mang chứa TBT ra khỏi bình nitơ lỏng, để cân bằng trong không khí 5 giây, nhúng vào nước ấm 33-35°C khoảng 10 giây, chuyển TBT vào đĩa nhựa  $\Phi$ 35 trong ống. Dùng pipette Pasteur hút TBT từ đĩa  $\Phi$ 35 chuyển qua môi trường rã đông 1 (TCM-199+10% FBS+0,25M Sucrose) 1,5 phút, môi trường rã đông 2 (TCM-199+10% FBS+0,15M Sucrose) 1,5 phút, môi trường rã đông 3 (TCM-199+10% FBS) 5 phút ở nhiệt độ phòng (25-28°C), tiếp tục chuyển TBT vào đĩa chứa môi trường nuôi (tương ứng với từng lô thí nghiệm) để trong tủ nuôi (38,5°C, 5% CO<sub>2</sub>) khoảng 2-3 giờ để giúp TBT hồi phục hoàn toàn trước khi đánh giá sự sống chết của TBT [4, 9].

#### **Đánh giá tế bào trứng sau đông lạnh, giải đông**

Đánh giá qua sự quan sát hình thái: TBT sống có tế bào chất đồng đều, màu sáng, màng trong suốt nhìn rõ, dễ quan sát; TBT chết màng tế bào bị tổn thương trong quá trình đông lạnh, tế bào chất bị co hoặc phân mảnh, màng tế bào có thể bị gãy.

Đánh giá theo nhuộm AO/PI các TBT được cho là sống theo hình thái: TBT sống là những

TBT có màu xanh do thuốc nhuộm AO phát ra; TBT chết là những TBT có nhân màu cam, màu này chính là sự kết hợp giữa màu xanh do AO phát ra và màu đỏ do PI phát ra.

#### **Nuôi chín tế bào trứng**

Sau giải đông, chuyển 20 TBT GV được cho là sống theo hình thái vào giếng nuôi chứa môi trường nuôi cấy 1 (TCM-199+10% FBS+5% FCS+10 ng/ml EGF+50  $\mu$ g/ml Gentamycin+0,2 mM Natri pyruvate+10 IU/ml hCG) hoặc 2 (môi trường 1 bổ sung 10% dịch nang trứng), nuôi trong tủ ẩm ở điều kiện 38,5°C, 5% CO<sub>2</sub>, hơi nước bão hòa. Theo dõi sự chín của TBT sau 20-24 giờ nuôi cấy qua độ giãn cumulus. Chọn các TBT chín để chuẩn bị TTTON.

#### **Thụ tinh trong ống nghiệm**

Dùng tinh trùng đông lạnh trong cọng rạ, giải đông và xử lý bằng môi trường BO đạt mật độ 5-6 $\times$ 10<sup>6</sup> tinh trùng/ml [11], tạo các vi giọt thụ tinh. Chuyển 15-20 TBT chín vào mỗi vi giọt thụ tinh (có sẵn tinh trùng với thể tích 100  $\mu$ l/giọt) trong đĩa 4 giếng có phủ dầu khoáng. Phủ dầu khoáng cho bao phủ hết vi giọt. Đặt đĩa trên vào tủ nuôi ở 38,5°C; 5% CO<sub>2</sub> trong 5-6 giờ. Sau đó, quan sát đánh giá kết quả thụ tinh.

#### **Nuôi phôi**

Phôi được nuôi trong vi giọt môi trường CR1aa bổ sung 5% FBS (100  $\mu$ l/giọt), đĩa nuôi được phủ dầu khoáng và nuôi ở 38,5°C; 5% CO<sub>2</sub>. Sự phân chia của hợp tử được đánh giá dựa vào sự phân chia tế bào ở thời điểm 46-48 giờ sau thụ tinh. Tỷ lệ thụ tinh trong nghiên cứu được tính dựa trên số phôi ở giai đoạn 2 tế bào. Sau 3 ngày nuôi cấy, tiến hành đánh giá tốc độ phân chia tại các mốc thời gian: 3-4 ngày nuôi cấy (phôi 8-16 tế bào); 5-6 ngày nuôi cấy (phôi dâu); 7-8 ngày nuôi cấy (phôi nang).

#### **Xử lý số liệu**

Tất cả số liệu của nghiên cứu được xử lý bằng phần mềm Minitab 16.

#### **KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

##### **Kết quả đông lạnh, giải đông**

*Đánh giá theo hình thái*

Kết quả ở hai phương pháp đông lạnh được thể hiện ở bảng 1.

Bảng 1 cho thấy, tỷ lệ thu hồi ở lô cọng rạ đạt 96,01% và lô vi giọt đạt 97,13%, sự khác biệt không có ý nghĩa thống kê ( $p>0,05$ ). Số

lượng TBT bị thất thoát trong quá trình thu hồi không đáng kể (3-4%). Hiện nay, các nghiên cứu trên thế giới đều thu hồi TBT sau giải đông đạt 95-100%. Như vậy, kết quả thu hồi TBT sau giải đông trong nghiên cứu của chúng tôi đạt khá cao.

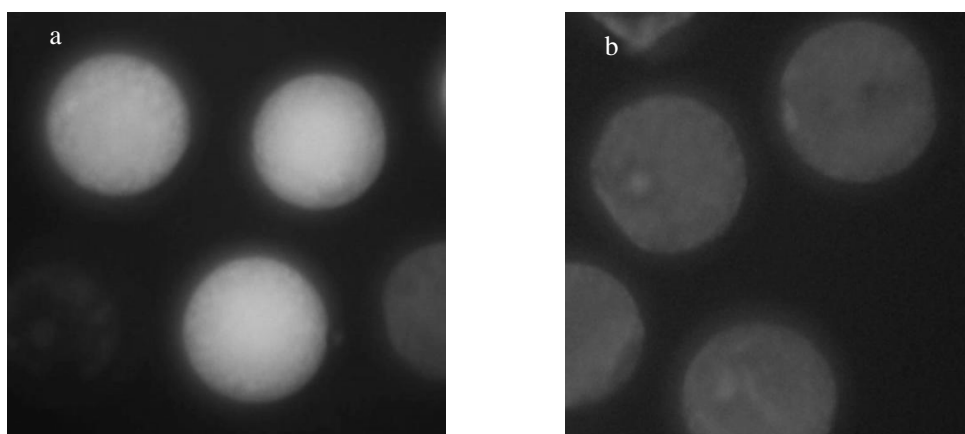
*Bảng 1. Kết quả đông lạnh tế bào trứng giai đoạn túi mầm*

Vật mang	Số TBT đem đông lạnh	Tỷ lệ TBT thu hồi (%)	Tỷ lệ TBT sống/đông lạnh (%)	Tỷ lệ TBT sống/thu hồi (%)
Cọng rạ	1528	96,01±0,50 (1467 TBT)	68,52±1,19* (1047 TBT)	71,37±1,18*
Vi giọt	2151	97,13±0,44 (2097 TBT)	73,53±1,17* (1574 TBT)	75,70±1,15*

\*: khác nhau theo cột, có ý nghĩa về mặt thống kê với  $p<0,01$ .

Tỷ lệ TBT sống trên tổng số TBT đem đông lạnh ở cọng rạ và vi giọt lần lượt đạt 68,52% so với 73,53% ( $p<0,01$ ); tỷ lệ sống trên tổng số TBT thu hồi đạt 71,37% so với 75,70% ( $p<0,01$ ), tương ứng. Như vậy, tỷ lệ sống theo hình thái ở phương pháp thủy tinh hóa bằng vi giọt cao hơn thủy tinh hóa bằng cọng rạ. Kết quả này phù hợp với kết quả thu được của Dinnyes et al. (2000) [5]. Dinnyes cho rằng cọng rạ tạo một lớp cách nhiệt giữa môi trường chứa TBT và nitơ lỏng nên làm giảm tốc độ làm lạnh, sự thủy tinh hóa có thể không hoàn toàn nên ảnh hưởng đến khả năng sống của TBT sau giải đông. Ngược lại, với phương pháp thủy tinh hóa trong vi giọt, môi trường chứa mẫu được tiếp xúc trực tiếp với nitơ lỏng nên khắc phục được nhược điểm của thủy tinh hóa trong cọng

rạ. Vì vậy, tỷ lệ TBT sống sau giải đông có phần cao hơn. Khi so sánh kết quả đạt được với các nghiên cứu được công bố, thấy rằng kết quả này còn thấp hơn nhiều so với Abe et al. (2005) [1]: 98% và 96%; Kim et al. (2007) [9]: 80,9% và 84%. Kết quả nghiên cứu của chúng tôi chưa cao, điều này có thể được giải thích như sau: (i) Chất lượng TBT chưa đồng đều về mặt di truyền, độ tuổi do nguồn mẫu thu nhận từ các lò mổ địa phương; (ii) TBT là đối tượng rất khó bảo quản lạnh do nước chiếm hơn 80% thể tích [12]; (iii) Quy trình thủy tinh hóa đòi hỏi tế bào tiếp xúc với chất bảo vệ lạnh với nồng độ cao, làm dung dịch ngoại bào ưu trương hơn nhiều, từ đó có thể làm tổn hại đến màng và ảnh hưởng đến khả năng sống của TBT.



*Hình 1. Kết quả nhuộm AO/PI: a. TBT sống; b. TBT: chết (X20)*

**Bảng 2.** Kết quả đánh giá theo phương pháp nhuộm AO/PI

Nguồn TBT	Số TBT đem nhuộm	Số TBT sống	Tỷ lệ sống
Cọng rạ	186	98	52,69±3,66**
Vi giọt	180	87	48,33±3,72**
Đối chứng	182	131	71,98±3,3**

\*\* : khác nhau theo cột, có ý nghĩa thống kê với  $p < 0,001$ .

*Đánh giá theo nhuộm AO/PI (Acridine orange/propidium iodide)*

Các TBT sau khi được đánh giá theo hình thái, lấy một phần đem đánh giá theo phương pháp nhuộm AO/PI, số còn lại đem nuôi chín để dùng cho TTTON. Đồng thời cũng tiến hành nhuộm các TBT tươi (chưa qua đông lạnh) làm lô đối chứng. Kết quả đánh giá theo phương pháp nhuộm AO/PI được thể hiện trong hình 1 và bảng 2.

Tỷ lệ sống theo phương pháp nhuộm AO/PI khi dùng cọng rạ hay vi giọt đều khác biệt so với lô đối chứng. Khi xét riêng từng cặp cho thấy tỷ lệ sống theo hình thái và theo phương pháp nhuộm ở lô cọng rạ, ở lô vi giọt đều có sự khác biệt đáng kể: 52,69% so với 66,22% và 48,33% so với 71,18%,  $p < 0,001$ , tương ứng; riêng cặp thí nghiệm (ở lô cọng rạ và lô vi giọt) sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ). Nguyên nhân có thể là do thao tác nhuộm TBT: TBT phải được làm sạch cumulus trước khi nhuộm và được rửa nhiều lần trước và sau khi nhuộm (khoảng 6 lần), chính điều này

có thể đã làm tổn thương màng TBT, gây chết TBT. Mặt khác, nồng độ sucrose của môi trường thủy tinh hóa sử dụng trong thí nghiệm là 0,5 M, thấp hơn so với các thí nghiệm của các tác giả khác (1 M). Có thể với nồng độ đường thấp, TBT chưa loại bỏ hết nước bên trong, vì vậy khi giải đông, hình thái TBT vẫn tròn, giống như hình thái TBT sau giải đông được đánh giá là sống qua hình thái, gây nhầm lẫn trong đánh giá. Ngoài ra, có thể các TBT trong quá trình bảo quản lạnh đã bị apoptosis, nhưng khi đánh giá bằng hình thái vẫn chưa nhận biết được do hình dạng còn tròn đều, nên dẫn đến tỷ lệ sống theo đánh giá bằng phương pháp nhuộm có sự cách biệt so với hình thái. Điều này cũng hợp lý, vì TBT rất khó bảo quản và tỷ lệ thụ tinh của đối tượng này thường rất thấp. Hiện nay, trong nước, vẫn chưa có công trình nghiên cứu nào về bảo quản lạnh TBT bỏ sử dụng phương pháp đánh giá này, vì vậy, kết quả đánh giá chỉ mang tính khởi đầu.

**Kết quả nuôi chín TBT từ nguồn TBT GV đông lạnh**

**Bảng 3.** Kết quả nuôi chín tế bào trứng giai đoạn túi mầm đông lạnh

Vật mang	Số TBT đem nuôi	Tỷ lệ sống sau nuôi (%)	Tỷ lệ TBT chín trên số TBT đem nuôi (%)	Tỷ lệ TBT chín trên số TBT sống sau nuôi (%)
Cọng rạ	861	51,80±1,70 <sup>a</sup> (446 TBT)	20,79±1,38 <sup>a</sup> (179 TBT)	40,13±2,32 <sup>a</sup>
Vi giọt	868	50,81±1,70 <sup>a</sup> (441 TBT)	12,79±1,13 <sup>a</sup> (111 TBT)	25,17±2,07 <sup>a</sup>
Đối chứng	180	95,00±1,62 <sup>a</sup> (171 TBT)	68,33±3,47 <sup>a</sup> (123 TBT)	71,93±3,44 <sup>a</sup>

a: khác nhau theo cột có ý nghĩa thống kê ( $p < 0,001$ ).

Tỷ lệ sống sau khi nuôi ở lô cọng rạ và lô vi giọt có sự khác biệt nhau và thấp hơn 1,8 lần so với lô đối chứng ( $p < 0,001$ ). Nguồn TBT được giải đông từ cọng rạ và vi giọt đều có TBT đạt đến giai đoạn chín và cả hai nguồn đều có tỷ lệ

sống sau đông lạnh tương đương nhau ( $p > 0,05$ ). Nguồn TBT giải đông từ cọng rạ cho tỷ lệ chín cao hơn gấp 1,6 lần so với nguồn TBT giải đông từ vi giọt (20,79% so với 12,79%,  $p < 0,001$ ). Tuy nhiên, cả hai nguồn TBT này đều có tỷ lệ

chín thấp hơn rất nhiều so với lô đối chứng (68,33%,  $p < 0,001$ ).

Tỷ lệ sống của TBT theo hình thái sau khi nuôi 22-24 giờ trong thí nghiệm đạt 50-51%. Kết quả này có phần cao hơn so với một số tác giả khác đã công bố, Abe et al. (2005) [1]: 10%; Cetin et al. (2006) [4]: 13,3%; Yamada et al. (2007) [14]: 11,7%; Prentice (2010) [12]: 10%. Tỷ lệ này còn thấp hơn rất nhiều so với công bố của Abe et al. (2005) [1]: 64%; Cetin et al. (2006) [4]: 31,6%; Kim et al. (2007) [9]: 41%

và 27%; Prentice (2010) [12]: 24%; Hajarjan et al. (2011) [7]: 36,2% và 29,5%. Kết quả của chúng tôi là một trong số ít các nghiên cứu khởi đầu ở Việt Nam về hướng này.

#### **Kết quả thụ tinh trong ống nghiệm từ TBT GV đông lạnh được nuôi chín**

Tiến hành TTTON từ các TBT GV được đông lạnh bằng cọng rạ (CR), đông lạnh bằng vi giọt (VG); từ nguồn TBT tươi làm đối chứng (ĐC). Kết quả thể hiện ở bảng 4.

**Bảng 4.** Kết quả TTTON từ nguồn tế bào trứng giai đoạn túi mầm đông lạnh được nuôi chín

Nguồn TBT từ	Số TBT đem thụ tinh	Tỷ lệ (%) các giai đoạn phát triển của phôi			
		2 tế bào	8-16 tế bào	Dâu	Nang
CR	179	15,64±2,72 <sup>b</sup> (28)	9,50±2,19 <sup>b</sup> (17)	3,35±1,35 <sup>b</sup> (6)	1,12±0,79 <sup>b</sup> (2)
VG	111	12,61±3,15 <sup>b</sup> (14)	7,21±2,45 <sup>b</sup> (8)	2,70±1,54 <sup>b</sup> (3)	00,00 <sup>b</sup> (0)
ĐC	123	51,22±4,51 <sup>b</sup> (63)	36,59±4,34 <sup>b</sup> (45)	25,20±3,91 <sup>b</sup> (31)	18,70±3,52 <sup>b</sup> (23)

b: thể hiện sự khác biệt theo cột, có ý nghĩa về mặt thống kê ( $p < 0,001$ ).

Tỷ lệ thụ tinh ở lô cọng rạ cao hơn lô vi giọt (15,64% so với 12,61%), sự khác biệt này không có ý nghĩa thống kê ( $p > 0,05$ ), nhưng cả 2 lô đều thấp hơn rất nhiều so với lô ĐC từ 3-4 lần (51,22%). Tỷ lệ TTTON của chúng tôi thấp hơn rất nhiều so với kết quả của Vieira et al. (2002) [13]: 49%; Abe et al. (2005) [1]: 37,7%; Kim et al. (2007) [9]: 55,7%; Prentice (2010) [12]: 42% ở nhóm không cân bằng và 59% ở nhóm cân bằng. Tuy nhiên, kết quả của chúng tôi cao hơn so với công bố của Mastumoto et al. (2001) [10]: 7% khi dùng vật mang là lưới nylon. Ở lô cọng rạ, chỉ có 1,12% (2 phôi) phát triển đến giai đoạn phôi nang. Trong các nghiên cứu hiện nay đều cho thấy, tỷ lệ thụ tinh và sự phát triển về sau của phôi từ các TBT GV đã được thủy tinh hóa giảm rất nhiều so với nhóm đối chứng (TBT tươi). Tỷ lệ thụ tinh và phát triển của phôi từ các TBT GV được thủy tinh hóa còn thấp là do nhiều nguyên nhân. TBT có cấu trúc phân tử phức tạp, một trong số cấu trúc này là các sợi trục của thoi vô sắc trong quá trình giảm phân rất nhạy cảm với nhiệt độ thấp, áp suất thẩm thấu và số lượng các ion (ionic strength) [6]. Các nghiên cứu trước đây cho

thấy, việc tiếp xúc của các TBT GV với các chất bảo vệ lạnh hoặc sự thủy tinh hóa làm cho hình dạng của thoi vô sắc, cấu trúc nhiễm sắc thể và sự phân bố của vi sợi bất thường nhiều hơn sau khi nuôi chín trong ống nghiệm. Các bất thường về tế bào học có thể ảnh hưởng không tốt đến sự phát triển của phôi sau khi thụ tinh [9]. Kết quả của Kim et al. (2007) [9] chỉ có 2,3% phát triển đến giai đoạn phôi nang; của Abe et al. (2005) [1] có 8% phát triển đến phôi nang khi dùng chất bảo vệ là EG kết hợp với Ficoll và sucrose, nhưng khi thay sucrose bằng trehalose thì không có phôi nào phát triển đến giai đoạn phôi nang. Trong quá trình thực hiện thí nghiệm, chúng tôi nhận thấy tỷ lệ thụ tinh thấp là do những nguyên nhân sau:

(i) TBT GV sau khi được thủy tinh hóa thường dễ bị bong tróc lớp tế bào cumulus, bị tổn thương cấu trúc phân tử, vì vậy, ảnh hưởng đến tỷ lệ chín sau khi nuôi, từ đó ảnh hưởng tới tỷ lệ thụ tinh và phát triển về sau của phôi;

(ii) Chất lượng TBT chưa đồng đều về mặt di truyền, độ tuổi nên đã ảnh hưởng không nhỏ đến tỷ lệ thụ tinh và phát triển về sau của phôi;

(iii) Môi trường nuôi cấy và mật độ phôi có ảnh hưởng đến sự phát triển các giai đoạn phôi tiếp theo đối với các phôi tạo ra trong ống nghiệm. Môi trường IVF trong thí nghiệm dùng là môi trường BO, môi trường nuôi phôi là CR1aa. Mật độ từ 15-20 phôi trong 100  $\mu$ l/vi giọt. Theo Bavister et al. (1995) [3], khi chọn mật độ nuôi thích hợp, các tế bào cumulus đi cùng với phôi có thể tiết các chất dinh dưỡng nuôi phôi hoặc loại bỏ các thành phần ức chế khỏi môi trường nuôi cấy. Theo Ahern & Gardner (1998) [2], khi giảm mật độ phôi/thể tích nuôi cấy sẽ kích thích cho sự phát triển của khối tế bào bên trong. Chính điều này giải thích cho khả năng sống của phôi tăng lên khi nuôi trong một thể tích giảm. Trong thí nghiệm của chúng tôi, số lượng phôi phát triển đến các giai đoạn tiếp theo khá thấp (6 hợp tử) nên có thể giảm khả năng sống và phát triển về sau;

(iv) Tỷ lệ thụ tinh ở lô cọng rạ, vi giọt và đối chứng lần lượt là 15,64 $\pm$ 2,72%; 12,61 $\pm$ 3,15% và 51,22 $\pm$ 4,51%, nhưng tỷ lệ phát triển đến giai đoạn phôi nang rất thấp, chỉ có 1,12 $\pm$ 0,79% ở lô cọng rạ; không có phôi nào phát triển đến giai đoạn phôi nang ở lô vi giọt; ngay cả ở lô đối chứng (không qua đông lạnh) cũng chỉ có 18,70 $\pm$ 3,52%. Như vậy, có thể trong số các TBT được thụ tinh đã có các TBT thụ tinh đa tinh trùng, có các TBT có tiền nhân phát triển không cân đối và có thể có những bất thường khác nên không thể phân chia đến các giai đoạn tiếp theo. Otoi et al. (1997) [11] công bố thu được tỷ lệ thụ tinh đạt 82,28%, trong đó có tới 14,58% thụ tinh đa tinh trùng. Theo Khurana & Niemann (2000) [8], trong 66,22% tỷ lệ thụ tinh mà họ thu được có tới 12,97% bất thường.

Kết quả nghiên cứu của chúng tôi được coi là kết quả đầu tiên ở Việt Nam cho tới thời điểm này. Tuy nhiên, cần có nhiều nghiên cứu được tiến hành nhằm nâng cao tỷ lệ thụ tinh và phát triển của phôi.

#### KẾT LUẬN

Đã bảo quản lạnh thành công TBT bò ở giai đoạn GV, dùng vật mang cọng rạ và vi giọt, tỷ lệ sống sau đông lạnh giải đông lần lượt là 68,52 $\pm$ 1,19% và 72,53 $\pm$ 1,17% ( $p < 0,001$ ).

Nuôi chín *in vitro* tế bào trứng giai đoạn GV được bảo quản lạnh bằng phương pháp thủy tinh hóa trong cọng rạ, vi giọt với tỷ lệ chín đạt 20,79 $\pm$ 1,38% và 12,79 $\pm$ 1,13%, tương ứng, ( $p < 0,001$ ).

Tạo phôi *in vitro* từ nguồn tế bào trứng giai đoạn GV đông lạnh bằng cọng rạ và được nuôi chín *in vitro*, tỷ lệ thụ tinh đạt 15,64 $\pm$ 2,72%, có phôi phát triển đến giai đoạn phôi nang.

**Lời cảm ơn:** Xin chân thành cảm ơn các cán bộ của Công ty Kỹ nghệ súc sản Vissan, lò mổ Thành Vinh đã cung cấp cho chúng tôi thu nhận mẫu buồng trứng bò. Xin chân thành cảm ơn Phòng thí nghiệm Nghiên cứu và Ứng dụng tế bào gốc đã tạo điều kiện cho chúng tôi thực hiện nghiên cứu này.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Abe Y., Hara K., Matsumoto H., Kobayashi J., Sasada H., Ekwall H., Rodriguez-Martinez H., Sato E., 2005. Feasibility of a nylon-mesh holder for vitrification of bovine germinal vesicle oocytes in subsequent production of viable blastocysts. *Biol. Reprod.*, 72(6): 1416-20.
2. Ahern T. J., Gardner D. K., 1998. Culturing bovine embryos in groups stimulates blastocyst development and cell allocation to the inner cell mass. *Theriogenology*, 49: 194.
3. Bavister B. D., 1995. Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts. *Hum. Reprod. Update*, 1(2): 91-148.
4. Cetin Y., Bastan A., 2006. Cryopreservation of immature bovine oocytes by vitrification in straws. *Anim. Reprod. Sci.*, 92(1-2): 29-36.
5. Dinnyes A., Dai Y., Jiang S., Yang X., 2000. High developmental rates of vitrified bovine oocytes following parthenogenetic activation, in vitro fertilization, and somatic cell nuclear transfer. *Biol. Reprod.*, 63(2): 513-518.
6. Fuku E., Xia L., Downey B. R., 1995. Ultrastructural changes in bovine oocytes cryopreserved by vitrification. *Cryobiology*, 32(2): 139-156.

7. Hajarian H. A. W. H., Rosnina Y., Daliri M., Dashtizad M., Holmes R., Abas M. O., 2011. Nuclear maturation of immature bovine oocytes after vitrification using open pulled straw and cryotop methods. *Afr. J. Biotechnol.*, 10(12): 2334-2339.
8. Khurana N. K., Niemann H., 2000. Effects of oocyte quality, oxygen tension, embryo density, cumulus cells and energy substrates on cleavage and morula/blastocyst formation of bovine embryos. *Theriogenology*, 54(5): 741-756.
9. Kim D. H., Park H. S., Kim S. W., Hwang I.S., Yang B. C., Im G. S., Chung H. J., Seong H.W., Moon S. J., Yang B. S., 2007. Vitrification of immature bovine oocytes by the microdrop method. *J. Reprod. Dev.*, 53(4): 843-851.
10. Matsumoto H., Jiang J. Y., Tanaka T., Sasada H., Sato E., 2001. Vitrification of large quantities of immature bovine oocytes using nylon mesh. *Cryobiology*, 42(2): 139-144.
11. Otoi T., Yamamoto K., Koyama N., Tachikawa S., Murakami M., Kikkawa Y., Suzuki T., 1997. Cryopreservation of mature bovine oocytes following centrifugation treatment. *Cryobiology*, 34(1): p. 36-41.
12. Prentice J. R., 2010. Vitrification of Bovine oocytes, Masters of Science, University of Saskatchewan Saskatoon, Saskatchewan, Canada.
13. Vieira A. D., Mezzalira A., Barbieri D. P., Lehmkuhl R. C., Rubin M. I., Vajta G., 2002. Calves born after open pulled straw vitrification of immature bovine oocytes. *Cryobiology*, 45(1): 91-94.
14. Yamada C., Caetano H. V., Simoes R., Nicacio A. C., Feitosa W. B., Assumpcao M. E., Visintin J. A., 2007. Immature bovine oocyte cryopreservation: comparison of different associations with ethylene glycol, glycerol and dimethylsulfoxide. *Anim. Reprod. Sci.*, 99(3-4): 384-388.

### **CRYOPRESERVATION OF THE GERMINAL VESICLE STAGE BOVINE OOCYTES BY USING VITRIFICATION METHOD IN STRAWS AND MICRODROPS**

**Nguyen Thi Thuong Huyen<sup>1,2</sup>, Lam Son Bich Tram<sup>3</sup>,  
Nguyen Quoc Dat<sup>4</sup>, Hoang Nghia Son<sup>5</sup>, Phan Kim Ngoc<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Ho Chi Minh city University of Natural Science

<sup>2</sup>Ho Chi Minh city University of Education

<sup>3</sup>Hung Vuong Hospital, Ho Chi Minh city

<sup>4</sup>National Institute of Animal Husbandry, Vietnam

<sup>5</sup>Intstitute of Tropical Biology, VAST

#### **SUMMARY**

This study aimed to examine the *in vitro* maturation and produce embryos of *in vitro* fertilization from the germinal vesicle stage bovine oocytes cryopreserved by vitrification method in straws and microdrops. The cumulus-oocyte complexes (COCs) with three or more layers of cumulus cells and homogeneous cytoplasm were selected for cryopreservation in two steps: oocytes were first equilibrated in the equilibrated solution for 45 seconds, then transferred to the vitrification solution for 25 seconds and loaded on straw or microdrop. Straws and microdrops were plunged directly into liquid nitrogen within 30 seconds. Oocytes were thawed in three steps through media: firstly, oocytes were directly expelled into medium for 1.5 minutes, then in second medium for 1.5 minutes and at last in third medium for 5 minutes. The thawing was performed at 25-28°C. The ratio of survival COCs was evaluated by morphological observation, then some of

them were evaluated by AO/PI stained method, the remaining were transferred to maturation medium 1 or 2 at 38,5°C in a humidified atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> in air for 20-24hrs. The matured COCs were used for *in vitro* fertilization. The ratios of survival COCs by morphological observation in straws and microdrops were 68.52±1.19% vs 73.53± 1.17% (p<0.05); by AO/PI stained method were 52.69±3.66% vs 48.33±3.72% (p>0.05); Metaphase II stage rates were 20.79±1.38% vs 12.79±1.13% (p<0.05); insemination rates (two-cell embryo) were 15.64±2.72% vs 12.61±3.15%; respectively; 2/28 embryos had developed to blastocyst (from straws).

**Keywords:** Cryopreservation, *in vitro* maturation, *in vitro* fertilization, vitrification.

*Ngày nhận bài:* 15-7-2013