

## ĐÁNH GIÁ KHẢ NĂNG PHÂN TÁCH TINH TRÙNG BÒ BLANC BLUE BELGE BẰNG PHƯƠNG PHÁP BOI NGƯỢC VÀ TẠO PHÔI *IN VITRO* VỚI TRỨNG BÒ LAI ZEBU TẠI VIỆT NAM

Nguyễn Hữu Đức<sup>1,✉</sup>, Phạm Thu Giang<sup>1</sup>, Trần Thị Bình Nguyễn<sup>1</sup>, Bùi Đại Phong<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Học viện Nông nghiệp Việt Nam

<sup>2</sup>Công ty cổ phần giống gia súc Hà Nội

✉Người chịu trách nhiệm liên lạc. E-mail: nhduc@vnua.edu.vn

Ngày nhận bài: 06.1.2020  
Ngày nhận đăng: 20.3.2020

### TÓM TẮT

Mục tiêu của nghiên cứu này là xác định điều kiện thích hợp cho việc phân tách tinh trùng bò Blanc-Blue-Belge (BBB) bằng phương pháp boi ngược; xác định môi trường nuôi thành thực trùng bò lai Zebu; và môi trường nuôi phôi sau thụ tinh *in vitro*. Sau khoảng thời gian 60-80 phút boi ngược trong môi trường CAP-05, tinh trùng bò BBB khỏe mạnh, tiến thẳng được phân tách với nồng độ đạt  $10^6$  tinh trùng/ml. Trứng bò lai Zebu phát triển và thành thực trong môi trường với thành phần cơ bản là TCM-199 có bổ sung 10% huyết thanh bê, FSH (0,75  $\mu\text{g/ml}$ ), LH (0,15  $\mu\text{g/ml}$ ) và Estradiol (2,5  $\mu\text{g/ml}$ ), kết quả cho thấy trong môi trường IVM-08 đạt tỷ lệ trứng thành thực cao hơn có ý nghĩa so với môi trường IVM-03, tỉ lệ trứng thành thực đạt lần lượt là 71,11% so với 51,69% ( $P < 0,01$ ). Thụ tinh *in vitro* trứng bò lai Zebu trong môi trường IVF-08. Phôi thụ tinh ống nghiệm (BBB x lai Zebu) được tạo ra từ tinh trùng phân tách theo phương pháp boi ngược đạt tỉ lệ phôi dâu-phôi nang tốt hơn trong môi trường IVC-09 so với môi trường IVC-06 (tương ứng 21,68% so với 8,56%,  $P < 0,01$ ). Kết luận là đã xác định được điều kiện thích hợp để phân tách tinh trùng BBB và tạo phôi (BBB x lai Zebu) trong ống nghiệm thành công. Đây là tiền đề để tạo tinh, phôi bò lai BBB có giới tính xác định.

**Từ khóa:** Tinh trùng bò BBB, phân tách, boi ngược, trứng bò lai Zebu, nuôi thành thực, thụ tinh ống nghiệm, nuôi cấy trong ống nghiệm, sản xuất phôi ống nghiệm.

### MỞ ĐẦU

Công nghệ tạo phôi *in vitro* trên đối tượng đại gia súc tại Việt Nam đã được đặt nền móng bằng những công trình nghiên cứu từ những năm 1994 tại Phòng Công nghệ Phôi, Viện Công nghệ sinh học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (Bùi Xuân Nguyên và cộng sự, 1994). Những năm tiếp theo, các nghiên cứu tại Viện Công nghệ sinh học, Viện Chăn nuôi, Học viện Nông nghiệp Việt Nam tập trung theo hướng cải thiện phương pháp, chất lượng của công nghệ tạo phôi *in vitro* cũng như đa dạng các đối tượng vật nuôi tham gia công

nghệ này (Duc *et al.*, 2003; Nguyen *et al.*, 2004; Nguyễn Thị Ước *et al.*, 1999, 2003; Nguyễn Việt Linh *et al.*, 2005; Nguyễn Hữu Đức *et al.*, 1998, 2003, 2007, 2013a, 2013b; Nguyễn Thị Thương *et al.*, 2018).

Bò Blanc-Blue-Belge (BBB) là giống bò thịt đặc biệt của thế giới được tạo ra từ nhiều giống bò địa phương của Bỉ với bò Shorthorn từ những năm 1919. Đây là một trong nhiều thành công lớn của công tác di truyền và tạo giống mới của Bỉ. Sau hơn 50 năm nghiên cứu tạo giống bò, BBB là giống bò thịt đặc biệt có cơ bắp phát triển siêu trội (hệ thống cơ đôi), ngoại

hình đẹp, khả năng sử dụng thức ăn tốt, thịt thơm ngon, hiệu quả kinh tế cao. Năm 2017, những con đực giống thuần BBB đầu tiên được Công ty Giống gia súc Hà Nội nhập về Việt Nam với mục tiêu sản xuất ngay tại Việt Nam tinh trùng đông lạnh của giống bò này phục vụ công tác lai tạo. Việc sử dụng nguồn tinh trùng này vào các nghiên cứu và ứng dụng công nghệ phối bò tại Việt Nam sẽ có giá trị lớn.

Nhằm tiếp tục nghiên cứu làm nền tảng cho định hướng đánh giá tinh phân tách giới tính và tạo phối bò BBB trong tương lai, chúng tôi tiến hành nghiên cứu này với mục đích là xác định khả năng phân tách, chọn lọc tinh trùng chất lượng tốt của giống bò BBB cũng như thử nghiệm khả năng để tạo ra phối ống nghiệm bò BBB từ nguồn tinh trùng nói trên. Nghiên cứu này không chỉ có ý nghĩa quan trọng trong bổ sung thông tin tạo phối bò lai BBB trong ống nghiệm mà còn có ý nghĩa trong định hướng sản xuất tinh, phối có giới tính xác định trong tương lai.

## VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### Hóa chất, dụng cụ, trang thiết bị

Các hóa chất chuyên dụng, môi trường pha chế, sử dụng trong nghiên cứu này đều đạt tiêu chí sử dụng trong *in vitro* và được cung cấp bởi các hãng hóa chất nổi tiếng như Sigma (Mỹ), Gibco (Anh). Nước dùng để pha các môi trường thao tác rửa trứng, môi trường lọc rửa tinh trùng,... đạt mức độ siêu sạch, được cung cấp bởi hệ thống máy siêu lọc Labconco (Mỹ).

Dụng cụ nhựa (đĩa thao tác và quan sát trứng, thụ tinh ống nghiệm, nuôi và quan sát phối, ống ly tâm) và thủy tinh được cung cấp bởi hãng NUNC, Eppendorf (Đức). Các dụng cụ nhựa này đều được vô trùng trước khi sử dụng. Buồng đếm Neubauer (Đức) được sử dụng trong việc đánh giá số lượng và chất lượng tinh trùng.

Buồng vô trùng cấp 2 (Class II) của hãng Labconco (Mỹ) được sử dụng trong việc tạo tiểu môi trường vô trùng trong quá trình thao tác với tinh trùng và trứng, phối. Trứng và phối được quan sát, đánh giá trên kính hiển vi soi nổi

Nikon (Nhật Bản). Quá trình nuôi thành thực trứng, thụ tinh ống nghiệm và nuôi phối diễn ra trong tủ nuôi Sanyo (Nhật Bản).

### Tinh cọng rạ của giống bò BBB và buồng trứng bò lai Zebu

Tinh cọng rạ (0,25ml) của giống bò BBB (Blanc-Blue-Belge) được cung cấp bởi Công ty cổ phần giống gia súc Hà Nội. Các cọng tinh này được bảo quản trong nitrogen lỏng ( $-196^{\circ}\text{C}$ ). Bò đực giống BBB được nuôi theo tiêu chuẩn bò đực giống tại cơ sở chăn nuôi tập trung của Công ty tại Gia Lâm-Hà Nội. Tinh trùng của đực giống BBB được đông lạnh theo quy trình chuẩn của hãng Minitube (Đức).

Buồng trứng bò lai Zebu được thu từ bò cái tại các cơ sở giết mổ vùng Hà Nội, các bước cụ thể như sau: 1/ Chuẩn bị môi trường nước muối sinh lý ấm  $37^{\circ}\text{C}$ , môi trường PBS (Phosphate Buffered Saline) ấm  $37^{\circ}\text{C}$ , cả hai loại môi trường trên có bổ sung kháng sinh Penicilin 100.000UI/lít và Streptomycine 0,005gr/lít; 2/Khi bò cái vừa được mổ bụng thì dùng panh và kéo vô trùng cắt ngay hai buồng trứng, rửa chúng 02 lần bằng nước muối sinh lý ấm và 02 lần bằng môi trường PBS ấm; 3/ Bảo quản buồng trứng trong tube Falcon loại 50 ml có chứa môi trường PBS ấm, bổ sung kháng sinh Penicilin 100.000UI/lít và Streptomycine 0,005gr/lít và vận chuyển về phòng thí nghiệm trong vòng 2-4 giờ kể từ khi thu buồng trứng.

Trong quá trình thu và vận chuyển, tube Falcon nói trên được đặt trong thiết bị chuyên dụng Cryologic (Australia) nhằm ổn định nhiệt độ thường xuyên ở  $37^{\circ}\text{C}$ .

### Phân tách tinh trùng bò BBB bằng phương pháp bơi ngược

Tinh trùng đông lạnh dạng cọng rạ của giống bò BBB được sử dụng cho thí nghiệm này. Cọng tinh được giải đông bằng cách chuyển từ nơi cất giữ (bình chứa nitrogen lỏng  $-196^{\circ}\text{C}$ ) sang bình ổn nhiệt có chứa nước ấm  $37^{\circ}\text{C}$ . Sau khi giải đông, dùng kéo vô trùng cắt một đầu cọng tinh và bơm từ từ phần dịch lỏng bên trong có chứa tinh trùng vào tube Eppendorf loại 0,5ml để bắt đầu đánh giá chất

lượng bằng cách sử dụng buồng đếm Neubauer trước khi thực hiện các bước tiếp theo.

Quá trình phân tách tinh trùng bò BBB được thực hiện bằng theo phương pháp bơi ngược, cụ thể: 1/Bơm nhẹ tinh trùng vào đáy của ống thủy tinh 5 ml có chứa sẵn môi trường CAP-05 (thành phần cơ bản bao gồm NaCl (6,5 gr), KCl (0,3 gr), MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O (0,1 gr), NaHCO<sub>3</sub> (3,1 gr), Glucose (3,5 gr), Na Pyruvate (0,1 gr)); 2/Đặt toàn bộ ống thủy tinh vào tủ nuôi để tinh trùng khỏe có chất lượng tốt có thể bơi ngược; Sau các khoảng thời gian khác nhau (20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 phút), thu 0,5 ml lớp tinh dung dịch bên trên để xác định số lượng và chất lượng tinh trùng.

#### **Khai thác và chọn lọc trứng bò từ buồng trứng**

Buồng trứng về đến phòng thí nghiệm được rửa lại 02-04 lần bằng môi trường PBS ấm mới. Trứng bên trong các nang trứng được giải phóng bằng cách dùng dao mổ cắt thành các hàng song song trên bề mặt buồng trứng. Khi thực hiện động tác này, cần ngâm buồng trứng trong môi trường TCM199 (Sigma) có bổ sung kháng sinh, cần tránh việc lẫn máu trong dịch thu nhận.

Sau đó, dịch hút có lẫn trứng được bơm vào đĩa petri NUNC có chứa sẵn môi trường PBS ấm vô trùng (lọc qua màng lọc Milipore trước khi dùng). Đĩa petri có trứng nói trên được đặt trên bàn ấm Minitube (Đức), có đậy nắp để tránh hiện tượng bay hơi của dung dịch. Bề mặt bàn ấm Minitube được đặt ổn định ở nhiệt độ 37°C trong suốt quá trình thao tác về sau.

Trứng bò được quan sát, phân loại và chọn lọc trên kính hiển vi soi nổi Nikon (Nhật Bản). Chỉ những trứng bò có chất lượng tốt hoặc khá mới được chọn để dùng trong các thí nghiệm tiếp theo. Quá trình quan sát, đánh giá và chọn lọc nói trên được thực hiện trong tủ hút vô trùng Labconco (Mỹ) với khoảng thời gian nhanh nhất có thể.

#### **Nuôi trứng bò lai Zebu thành thực trong ống nghiệm**

Sử dụng hai môi trường IVM-03 (không

bổ sung EGF) và IVM-08 (bổ sung 10ng EGF/ml) trong việc nuôi thành thực trứng bò. Nền tảng cơ bản của hai môi trường IVM-03 và IVM-8 là môi trường TCM-199 có bổ sung 10% huyết thanh bê, FSH (0,75 µg/ml), LH (0,15 µg/ml) và Estradiol (2,5 µg/ml). Các môi trường này pha chế ngay trước khi sử dụng và lọc vô trùng.

Quá trình nuôi thành thực của trứng bò được diễn ra trong điều kiện tủ nuôi Sanyo (Nhật Bản) với chế độ như sau: nhiệt độ 39°C, độ ẩm bão hòa, 5%CO<sub>2</sub>. Sau thời gian nuôi nói trên, từng trứng được tách khỏi lớp tế bào cận noãn bao quanh để đánh giá sự thành thực thông qua việc quan sát sự xuất hiện của thể cực (Đức và cs., 2013a). Quá trình này diễn ra trên kính hiển vi soi nổi Nikon.

#### **Thụ tinh trong ống nghiệm và nuôi phôi (BBB x lai Zebu)**

Tinh trùng có chất lượng tốt thu được từ quá trình phân tách và hoạt hóa nói trên được đưa vào môi trường IVF-08 (thành phần cơ bản gồm có NaCl (6,5 gr), KCl (0,3 gr), CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O (0,3 gr), NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O (0,1 gr), MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O (0,1 gr), NaHCO<sub>3</sub> (3,1 gr), Glucose (3,5 gr), Na Pyruvate (0,1 gr)).

Môi trường thụ tinh này có bổ sung Epinephrine (1 mM), Hypotaurine (10 µM), Penicillamine (20 µM). Quá trình thụ tinh giữa tinh trùng bò BBB và trứng bò lai Zebu thành thực nói trên được thực hiện trong 24 giờ trong tủ nuôi Sanyo ở điều kiện 39°C, 5% CO<sub>2</sub>, độ ẩm bão hòa (Đức *et al.*, 2013a). Nồng độ tinh trùng trong môi trường thụ tinh IVF-08 được khống chế ở 10<sup>6</sup> tinh trùng /ml.

Sau quá trình thụ tinh, các trứng được chuyển sang môi trường IVC-06 (không có huyết thanh bê), IVC-09 (bổ sung 05% huyết thanh bê) và phôi (nếu sự thụ tinh thành công) sẽ tiếp tục phân chia, phát triển trong tủ nuôi Sanyo ở điều kiện 39°C, 5%CO<sub>2</sub>, độ ẩm bão hòa.

#### **Xử lý số liệu**

So sánh sự khác nhau của hai giá trị thu nhận được thực hiện bằng hàm *F-test* và *T-test*.

Sự khác nhau giữa các số liệu so sánh được xem là có ý nghĩa thống kê khi giá trị  $P < 0,05$ .

## KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### Phân tách tinh trùng bò BBB trong ống nghiệm

Tinh trùng đông lạnh của bò giống BBB nuôi tại trại chăn nuôi thuộc công ty Cổ phần giống gia súc Hà Nội được sử dụng trong nghiên cứu này. Các mẫu tinh đông lạnh đều được kiểm tra trước khi đưa vào thí nghiệm. Trong mỗi cọng rạ, số lượng tinh trùng đạt từ  $12-16 \times 10^6$  con, trong đó có từ 32-38% tinh trùng có hình dạng bình thường, vận động tiến thẳng.

Sau những khoảng thời gian để tinh trùng tự vận động bơi ngược khác nhau, chúng tôi thu nhận và đánh giá khả năng phân tách của số tinh trùng có chất lượng tốt đã nói ở trên. Kết quả được trình bày ở bảng 1 dưới đây.

Kết quả bảng trên cho thấy trong khoảng thời gian bơi ngược 20-50 phút, số lượng tinh trùng tiến thẳng thu nhận có xu hướng tăng dần. Tuy nhiên, số lượng tinh trùng loại này thu nhận được là không cao, chỉ đạt 0,10 đến 1,00 triệu tinh trùng/ml.

Trong trường hợp kéo dài thời gian để tinh

trùng bơi ngược, cụ thể là tăng đến 60-80 phút thì số lượng tinh trùng tiến thẳng thu nhận là khá tốt. Trong các thí nghiệm, số lượng tinh trùng tiến thẳng thu nhận có thể đạt khoảng 1,25 triệu tinh trùng/ml. Kết quả này là khá tốt, có thể so sánh với các kết quả tại các phòng thí nghiệm nước ngoài khi tiến hành phân tách tinh trùng bằng phương pháp bơi ngược (Samardzija *et al.*, 2015).

Việc phân tách số tinh trùng theo phương pháp này có giá trị trong công nghệ thụ tinh trong ống nghiệm về sau (Arias *et al.*, 2017). Trong trường hợp thực hiện phương pháp phân tách không phù hợp, có thể tinh trùng vẫn còn sống, vận động tốt nhưng không còn khả năng thụ tinh thì cũng không đạt yêu cầu. Điều này rõ ràng có liên quan đến áp suất thẩm thấu của môi trường cũng như pH và thành phần môi trường.

Trong thí nghiệm này, chúng tôi sử dụng môi trường CAP-05 (pH 7,3) để tinh trùng có thể phân tách, bơi ngược (Rubessa *et al.*, 2016).

### Nuôi thành thực trứng bò lai Zebu trong ống nghiệm

Sau thời gian 24 giờ trong tủ nuôi Sanyo, trứng được mang ra và tách lớp tế bào cận noãn và đánh giá sự xuất hiện của thể cực bằng quan sát trên kính hiển vi (hình 1A). Kết quả được trình bày trong bảng 2.

**Bảng 1.** Khả năng phân tách và thu nhận tinh trùng bò BBB chất lượng tốt sau các khoảng thời gian bơi ngược khác nhau.

Thời gian bơi ngược (phút)	Tinh trùng chất lượng tốt thu nhận sau các khoảng thời gian bơi ngược		Đánh giá
	Số lượng (triệu con)	Nồng độ (triệu tinh trùng/ml)	
20	0,10-0,14	0,11±0,03 <sup>a</sup>	+
30	0,12-0,15	0,13±0,03 <sup>a</sup>	+
40	0,15-0,17	0,16±0,02 <sup>a</sup>	+
50	1,08-1,14	1,03±0,09 <sup>b</sup>	++
60	1,15-1,38	1,25±0,12 <sup>c</sup>	+++
70	1,19-1,34	1,27±0,20 <sup>c</sup>	+++
80	1,18-1,41	1,26±0,26 <sup>c</sup>	+++

(<sup>a</sup>, <sup>b</sup>, <sup>c</sup>  $P < 0,01$ )

**Bảng 2.** Kết quả thành thực trong ống nghiệm của trứng bò lai Zebu.

Môi trường nuôi trứng	Số trứng loại A sử dụng (n)	Số trứng và tỉ lệ thành thực	
		(n)	(%)
IVM-03	236	122	51,69 <sup>a</sup> (122/236)
IVM-08	225	160	71,11 <sup>b</sup> (160/225)

(<sup>a, b</sup> P<0,01)

Kết quả cho thấy tỉ lệ trứng bò lai Zebu đạt đến giai đoạn thành thực được cải thiện rõ rệt khi nuôi trong môi trường IVM-08 (đạt 71,11%) so với nuôi trong môi trường IVM-03 (chỉ đạt 51,69%). Sự khác nhau giữa hai tỉ lệ thành thực này là có ý nghĩa thống kê với P<0,01. Điều này cho thấy tác động dương tính rõ rệt của yếu tố EGF khi bổ sung vào môi trường nuôi thành thực trứng trong ống nghiệm

Yếu tố tăng trưởng biểu bì (EGF) đã được nhiều nghiên cứu chứng minh là có tác dụng tích cực đến quá trình thành thực trong ống nghiệm của trứng động vật. Trong các thí nghiệm *in vitro*, EGF góp phần tăng cường quá trình giãn nở của lớp tế bào cumulus bao quanh trứng, qua đó tạo thuận lợi cho quá trình xâm nhập của tinh trùng vào bên trong trứng ở giai đoạn tiếp theo. EGF được khẳng định là một trong những nhân tố có tác động tốt trong việc điều hòa sự trưởng thành và phát triển của tế bào trứng của động vật trong nuôi cấy *in vitro* (Lonergan *et al.*, 1996; Yong *et al.*, 2017).

### Tạo phôi bò (BBB x lai Zebu) trong ống nghiệm

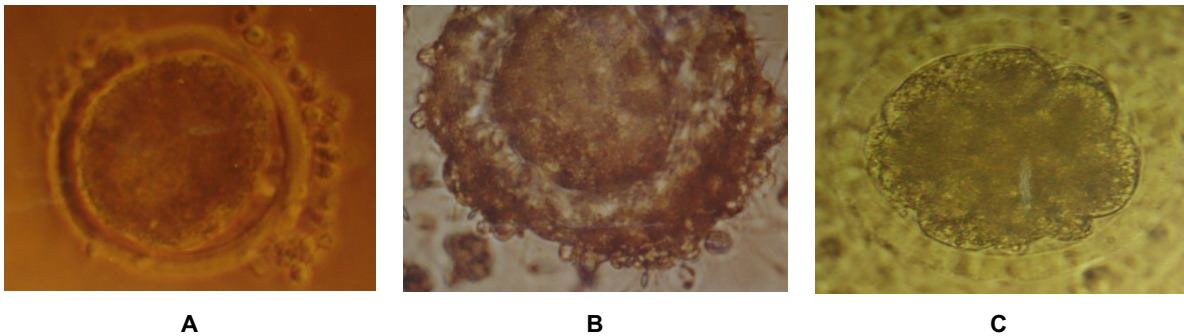
Trứng bò lai Zebu sau thụ tinh và nuôi cấy được quan sát trên kính hiển vi (hình 1B) để đánh giá khả năng tạo phôi dâu-phôi nang vào ngày thứ 6-7 sau thời điểm thụ tinh (hình 1C). Kết quả được trình bày ở bảng 3.

Kết quả cho thấy tỉ lệ phôi bò (BBB x lai Zebu) thu nhận ở giai đoạn phôi dâu-phôi nang được cải thiện rõ rệt khi nuôi trong môi trường IVC-09 (đạt 21,68%) so với nuôi trong môi trường IVC-06 (đạt 08,53%). Sự khác nhau giữa hai tỉ lệ phôi dâu-phôi nang này là có ý nghĩa thống kê với P<0,001. Điều này cho thấy tác động dương tính rất rõ rệt của yếu tố huyết thanh bê khi bổ sung vào môi trường nuôi phôi trong ống nghiệm. Điều này là phù hợp với kết quả của Leivas và đồng tác giả (2011) khi bổ sung huyết thanh bê vào môi trường nuôi cấy phôi sau thụ tinh. Các phôi này đủ chất lượng để thực hiện bước tiếp theo là lấy sinh thiết để xác định giới tính, từ đó biết được tỉ lệ giới tính của tinh trùng đã phân tách.

**Bảng 3.** Khả năng tạo phôi bò (BBB x lai Zebu) trong ống nghiệm.

Môi trường nuôi phôi	Số trứng loại A sử dụng (n)	Số phôi và tỉ lệ phôi dâu-phôi nang	
		(n)	(%)
IVC-06	258	22	08,53 <sup>a</sup> (22/258)
IVC-09	286	62	21,68 <sup>b</sup> (50/286)

(<sup>a, b</sup> P<0,01)



**Hình 1.** Một số hình ảnh của quá trình tạo phôi bò (BBB x lai Zebu) trong ống nghiệm. A. Trứng bò lai Zebu thành thực *in vitro* với sự xuất hiện của thể cực; B. Tinh trùng BBB thụ tinh *in vitro* với trứng bò lai Zebu; C. Phôi bò (BBB x lai Zebu) tạo ra từ quá trình thụ tinh *in vitro*.

## KẾT LUẬN

Phân tách tinh trùng bò BBB bằng phương pháp bơi ngược cho hiệu quả thu nhận tinh trùng chất lượng tốt là phù hợp với khoảng thời gian xử lý dao động từ 60-80 phút, môi trường CAP-05. Nồng độ tinh trùng thu nhận đạt  $10^6$  tinh trùng/ml, các tinh trùng này đủ số lượng và chất lượng sử dụng trong công nghệ thụ tinh ống nghiệm.

Trứng của bò lai Zebu phát triển và thành thực trong môi trường IVM-08 là cao hơn trong môi trường IVM-03, tỉ lệ trứng thành thực đạt lần lượt là 71,11% so với 51,69% ( $P < 0,01$ ).

Phôi thụ tinh ống nghiệm (BBB x lai Zebu) được tạo ra từ tinh trùng phân tách theo phương pháp bơi ngược đạt tỉ lệ phôi dâu-phôi nang tốt hơn trong môi trường IVC-09 so với môi trường IVC-06, tỉ lệ đạt 21,68% so với 08,53% ( $P < 0,01$ ).

**Lời cảm ơn:** Nghiên cứu này nhận được sự tài trợ từ đề tài cấp Bộ thuộc Quỹ Đổi mới Công nghệ Quốc gia-Bộ Khoa học và Công nghệ, mã số NATIF.TT.05.ĐT/2017 "Nghiên cứu sản xuất tinh bò BBB (Blance-Blue-Belge) thuần đồng lạnh dạng cộng rạ và thử nghiệm phương pháp phân tách tinh phân giới". Nhóm tác giả xin trân trọng cảm ơn.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

Arias ME, Andara K, Briones E, Felmer R. (2017).

Bovine sperm separation by Swim-up and density gradients (Percoll and BoviPure): effect on sperm quality, function and gene expression. *Reprod Biol* 17(2):126-132.

Bùi Xuân Nguyên, Nguyễn Hữu Đức, Lê Văn Ty, Nguyễn Thị Ước (1994). Kết quả bước đầu nghiên cứu nuôi trứng và thụ tinh *in vitro* ở trâu bò. *Kỹ yếu Viện Công nghệ sinh học*: 166-168.

Duc NH, Uoc NT, Ty LV, Hanh NV, Thanh NT, Bui LC, Anh NT, Huu QX, Nguyen BX (2003). Potential for *in vitro* production of embryo from follicular oocyte of Yellow and Yellow-RedSindhi crossbred cattle. *Theriogenology* 59(1): 442.

Yong Hwangbo, Oh Hae-In, Lee Sang-Hee, Cheong Hee-Tae, Yang Boo-Keun, Park Choon-Keun (2017). Treatment of Epidermal Growth Factor (EGF) enhances Nuclear Maturation of Porcine Oocytes and Stimulates Expression of ER/Golgi Transport Proteins. *Dev Reprod* 21(2):131-138.

Leivas FG, Brum DS, Fialho SS, Saliba WP, Alvim MT, Bernardi ML, Rubin MI, Silva CA (2011). Fetal calf serum enhances *in vitro* production of *Bos taurus indicus* embryos. *Theriogenology* 75(3):429-33.

Lonergan P, Carolan C, Van Langendonck A, Donnay I, Khatir H, Mermillod P (1996). Role of epidermal growth factor in bovine oocyte maturation and preimplantation embryo development *in vitro*. *Biol Reprod* 54(6):1420-1429.

Nguyễn Thị Ước, Nguyễn Hữu Đức, Lê Văn Ty, Bùi Linh Chi, Hoàng Nghĩa Sơn, Bùi Xuân Nguyên (1999). Sản xuất phôi bò bằng thụ tinh trong ống nghiệm. *Kỹ yếu Hội nghị Công nghệ sinh học toàn quốc*: 934-936.

Nguyễn Thị Ước, Lê Văn Ty, Nguyễn Hữu Đức, Nguyễn Việt Linh, Nguyễn Văn Hạnh, Bùi Linh Chi, Nguyễn Trung Thành, Nguyễn Thùy Anh, Hoàng Nghĩa Sơn, Dương Đình Long, Bùi Xuân Nguyên (2003). Nghiên cứu sản xuất bò sữa giống thương phẩm bằng cấy phôi thụ tinh ống nghiệm và xác định giới tính. *Kỷ yếu Hội nghị Công nghệ sinh học toàn quốc*: 717-719.

Nguyễn Hữu Đức, Nguyễn Thị Ước, Lê Văn Ty, Quán Xuân Hữu, Nguyễn Trung Thành, Bùi Linh Chi, Nguyễn Văn Hạnh, Nguyễn Thùy Anh, Nguyễn Việt Linh, Bùi Xuân Nguyên (2003). Kết quả thụ tinh ống nghiệm và cấy phôi ở bò Laisind. *Kỷ yếu Hội nghị Công nghệ sinh học toàn quốc*: 699-772.

Nguyen Bui Xuan, Uoc Nguyen Thi, Ty Le Van, Monson RL, Leibfried-Rutledge ML, Duc Nguyen Huu, Bui Linh Chi, Huu Quan Xuan, Hanh Nguyen Van, Thanh Nguyen Trung, Linh Nguyen Viet, Rutledge JJ (2004). Production of tropical dairy calves by embryo transfer using local Laisind (*Bos indicus*) recipients and intercontinental fresh IVF shipped embryos. *J Reprod Fert Devel* 16(1,2):249-250.

Nguyễn Hữu Đức, Nguyễn Thị Ước, Nguyễn Văn Hạnh, Nguyễn Việt Linh, Đặng Nguyễn Quang Thành, Quán Xuân Hữu, Nguyễn Thị Thùy Anh, Bùi Xuân Nguyên (2007). Nghiên cứu tạo phôi trâu (Murrah x Swamp buffalo) trong ống nghiệm. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 5(3): 299-305.

Nguyễn Hữu Đức, Nguyễn Thị Ước, Lê Văn Ty, Bùi Linh Chi, Bùi Xuân Nguyên (1998). Nghiên cứu chọn lọc tinh trùng bò dùng trong thụ tinh ống nghiệm. *Kỷ yếu Viện Công nghệ sinh học*: 169-174.

Nguyễn Hữu Đức, Đỗ Trung Kiên (2013a). Nghiên cứu phân lập, nuôi cấy trong ống nghiệm và bảo quản lạnh tế bào biểu mô ống dẫn trứng bò. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 11(1): 45-51.

Nguyễn Hữu Đức, Trần Thị Bình Nguyên, Lê Thị Châu (2013b). Ảnh hưởng của tế bào biểu mô ống dẫn trứng đến sự phát triển *in vitro* của phôi bò thụ tinh trong ống nghiệm. *Tạp chí Công nghệ Sinh học* 11(2): 225-234.

Nguyen Viet Linh, Nguyen Thi Uoc, Quan Xuan Huu, Nguyen Van Hanh, Nguyen Huu Duc, Nguyen Trung Thanh, Bui Linh Chi, Nguyen Khac Tich, Duong Dinh Long, Fabio de Rensis, Bui Xuan Nguyen (2005). Effect of 17 $\beta$ -Estradiol supplementation on the *in vitro* maturation and embryo production in swamp buffalo. *Proceedings of the 2nd Asian Reproduction Biotechnology Conference, Thailand*: 167.

Nguyễn Thị Thương, Nguyễn Tiến Đạt, Nguyễn Văn Hạnh, Nguyễn Hữu Đức, Nguyễn Việt Linh (2018). Effect of caffeine on *in vitro* fertilization of pig follicular oocytes. *Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam* 1(2): 182-186.

Rubessa M, Gaja A, Wheeler M B (2016). Separation of motile bovine spermatozoa for *in vitro* fertilization by electrical charge. *Andrology* (Los Angel) 5: 153.

Samardzija M, Getz I, Lojkic M, Valpotic H, Djuricic D (2015). Optimization of sperm for *in vitro* production of bovine. *SOJ Vet Sci* 1(2): 1-7.

## **EVALUATION OF THE SPERM SEPARABILITY OF BLANC-BLUE-BELGE BULL BY SWIM-UP METHOD AND *IN VITRO* EMBRYO PRODUCTION WITH HYBRID ZEBU BOVINE OOCYTE IN VIETNAM**

**Nguyen Huu Duc<sup>1</sup>, Pham Thu Giang<sup>1</sup>, Tran Thi Binh Nguyen<sup>1</sup>, Bui Dai Phong<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>*Vietnam University of Agriculture*

<sup>2</sup>*Hanoi Livestock Breeding Joint Stock Company*

### **SUMMARY**

The objective of this study was to determine the right conditions for the separation of Blanc-Blue-Belge bovine sperm (BBB) by swim-up method; determine the maturity of hybrid Zebu bovine eggs; and culture of embryos after *in vitro* fertilization. After 60-80 minutes of swim-up in CAP-05, BBB bovine sperms were healthy, straight movement and separated with a concentration of 10<sup>6</sup> sperm/ml. Hybrid Zebu bovine eggs developed and matured in the maturation medium with

the basic medium TCM-199 supplemented with 10% calf serum, FSH (0.75 µg / ml), LH (0.15 µg / ml) and Estradiol (2.5 µg / ml), the results showed that the IVM-08 medium had significantly higher maturation rates than IVM-03, the proportion of mature eggs reached 71,11% compared to 51.69%, respectively (P <0.01). *In vitro* fertilization of hybrid Zebu bovine egg in IVF-08 medium. *In vitro* fertilized embryos (BBB x hybrid Zebu) developed from bovine sperms separated by the swim-up method achieved a better rate of morula-blastocysts in IVC-09 than IVC-06 medium, 21.68% compared to 8.56%, respectively (P <0.01). The conclusion was that the suitable conditions for BBB bovine sperm separation and *in vitro* embryo production (BBB x hybrid Zebu) were determined. This is the premise to create bovine semen, BBB bovine embryos with defined gender.

**Keywords:** BBB bovine sperm, separation, swim-up, hybrid Zebu bovine oocyte, *in vitro* fertilization, *in vitro* fertilization, *in vitro* culture, *in vitro* embryo production