

THU NHẬN VÀ NUÔI CẤY TẾ BÀO SINH DƯỠNG BÁO GẤM [*NEOFELIS NEBULOSA* (GRIFFTH, 1821)]

HOÀNG NGHĨA SƠN, TRẦN CẨM TÚ

Viện Sinh học nhiệt đới

LÊ VĂN TY

Viện Công nghệ sinh học

Báo gấm [*Neofelis nebulosa* (Griffith, 1821)], thuộc cỡ lớn trong họ Mèo (Felidae), bộ Ăn thịt (Carnivora), sống ở rừng rậm nhiều tầng trên núi đất, núi đá [1].

Ở Việt Nam báo gấm phân bố ở Tuyên Quang, Lai Châu, Lạng Sơn, Sơn La, Vĩnh Phú, Hòa Bình, Kontum, Gia Lai, Lâm Đồng, Đồng Nai.... Đây là loài thú quý hiếm, cho da lông và dược liệu. Hiện nay, báo gấm đã trở nên quý hiếm, trong sách Đỏ Việt Nam (2000), báo gấm được xếp ở cấp độ V (sẽ nguy cấp) [1]. CITES - Hiệp ước về buôn bán quốc tế các loài động, thực vật hoang dã đang gặp nguy hiểm, đưa báo gấm vào các loài của phụ lục I (cấm buôn bán) [2]. Nước Mỹ cũng đưa báo gấm vào trong "Chứng thư các loài đang gặp nguy hiểm", nhằm ngăn chặn việc buôn bán báo gấm hay các bộ phận cơ thể chúng.

Với những tiến bộ vượt bậc của khoa học trên thế giới về kỹ thuật bảo tồn nguồn gen cấp độ tế bào, kỹ thuật cấy nhân tạo phôi cloning...

cùng những chủ trương, chính sách của Đảng và Nhà nước Việt Nam về bảo vệ các loài động vật hoang dã thì việc tiến hành thu nhận, nuôi cấy tế bào sinh dưỡng báo gấm nhằm bảo tồn nguồn gen loài này ở cấp độ tế bào là rất cần thiết. Việc bảo vệ nguồn gen cấp độ tế bào sẽ giúp chúng ta giảm bớt chi phí cho công việc bảo tồn, đồng thời phương pháp này cũng dễ dàng thực hiện và thích ứng các loại điều kiện, giai đoạn thu thập mẫu tế bào soma đơn giản và dễ thực hiện, ngay cả với những động vật mới bị chết. Tuy nhiên, để tái tạo ra những con vật thực sự theo phương pháp nhân bản thì đòi hỏi phải có nhiều thời gian và tiền bạc.

Kết quả bước đầu thu nhận được, nguyên bào sợi của báo gấm phát triển được trong môi trường DMEM bổ sung 10. - 15% FBS. Đòi hỏi về nồng độ FBS của tế bào báo gấm là cao hơn so với tế bào bò rừng, bò tót. Khả năng bám dính và lan tỏa tế bào của mẫu tươi tốt hơn mẫu đông lạnh.



Hình 1. Báo gấm nuôi nhốt tại Thảo Cầm Viên

I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Hóa chất

Dung dịch PBS(-); côn 70^o (China); môi trường DMEM (Gibco); FBS (Gibco); Trypsin (Sigma); EDTA (Merk); Non-essential amino acid (Sigma).

2. Vật liệu

Mảnh da tai báo gấm được thu nhận tại Thảo Cầm Viên, thành phố Hồ Chí Minh.

3. Phương pháp

a. Phương pháp thu nhận, xử lý và đông lạnh mẫu

Mẫu da tai báo gấm sau khi được thu nhận được rửa sạch trong môi trường PBS (-); một nửa cho vào tủy đông lạnh chứa 1 ml PBS 10% DMSO để đông lạnh và bảo quản trong ni-tơ lỏng -196^oC (đông lạnh chậm). Nửa còn lại cho vào effendorf chuyển về phòng thí nghiệm Tế bào động vật - Viện Sinh học nhiệt đới.

Mẫu tai báo gấm được xử lý qua những bước sau: effendorf chứa mẫu được xịt côn 70^oC rồi đưa vào tủ vô trùng. Mẫu được rửa qua dung dịch PBS (-) 3 lần, rồi tiến hành cạo sạch lông. Sau đó, ngâm mẫu vào côn trong vòng 30 giây và rửa lại 3 lần bằng dung dịch PBS (-).



Hình 2. Chuẩn bị dụng cụ thí nghiệm

b. Phương pháp nuôi sơ cấp mẫu mô

Tiến hành cắt nhỏ mẫu mô thành những mảnh có kích thước 0,5 × 0,5 mm. Sau đó, gắp những mảnh mô vào đĩa nhựa 4 giếng. Mỗi giếng từ 4 đến 5 mảnh mô. Chờ từ 20 đến 30 phút cho mẫu mô cố định trên mặt đĩa. Sau khi mẫu đã cố định bổ sung 400 μl môi trường DMEM 10% FBS và thêm 1% non-essential amino acid.

Chuyển vào tủ ấm 37-38^oC, 5% CO₂ nuôi cấy.

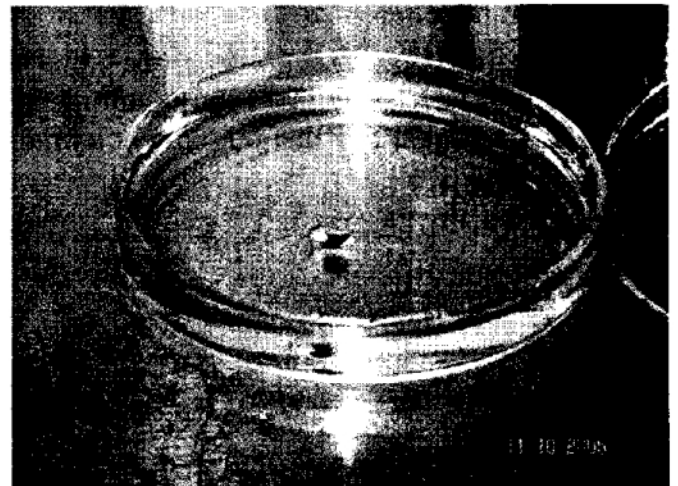
Sau mỗi 48 giờ kiểm tra và ghi nhận hình ảnh.

c. Phương pháp cấy chuyển

Gắp bỏ mảnh mô và bổ sung môi trường sau 5 - 7 ngày nuôi, quan sát sự phát triển của nguyên bào sợi, khi thấy tế bào lan hết mặt đĩa thì tiến hành cấy chuyển.

Hút bỏ hết môi trường cũ ra, bổ sung vào 200 μl trypsin/EDTA 0,25%, lắc nhẹ đĩa để tế bào tách khỏi mặt đĩa. Quan sát dưới kính hiển vi, khi thấy tế bào bung ra hết thì bổ sung thêm 200 μl môi trường DMEM 10% FBS để bất hoạt trypsin.

Hút 200 μl huyền phù tế bào vào đĩa 4 giếng mới và bổ sung thêm 200 μl môi trường DMEM 10-15% FBS. Tiếp tục nuôi trong tủ ấm 37-38^oC, 5% CO₂ và theo dõi kết quả phát triển.



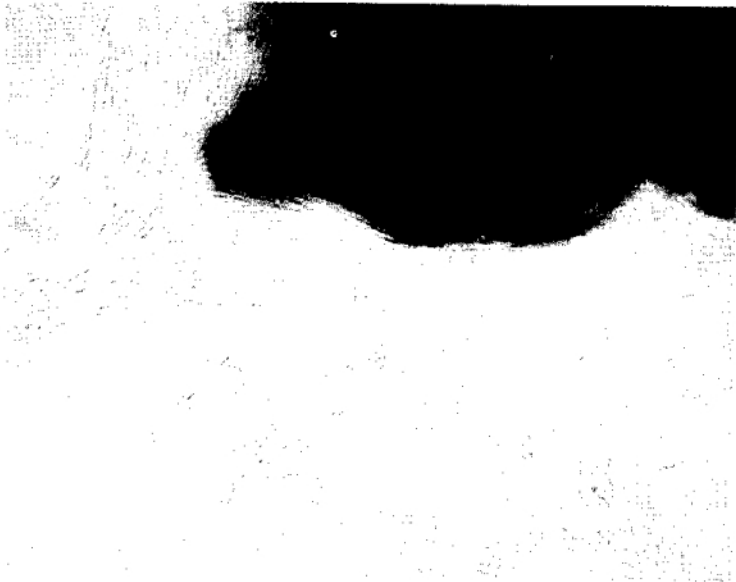
Hình 3. Mẫu mô tai báo gấm

II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

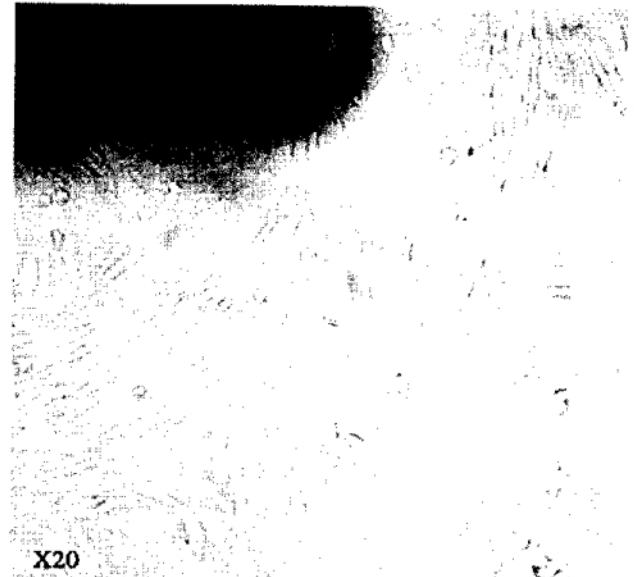
1. Kết quả nuôi cấy sơ cấp

Khi được nuôi nguyên phát từ mảnh mô, sau

7 ngày nuôi tế bào mọc lan ra và sau 14 ngày tế bào lan hết bề mặt đĩa 4 giếng, mẫu mô được gắp bỏ ra khỏi môi trường nuôi cấy và có thể tiến hành cấy chuyển ra đĩa 4 giếng mới.



Hình 4. Tế bào lan toả sau 7 ngày nuôi sơ cấp

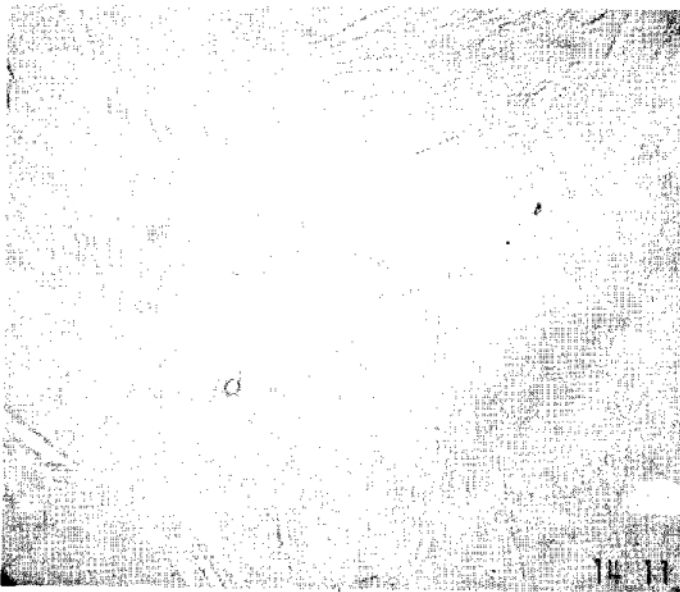


Hình 5. Tế bào lan toả sau 10 ngày nuôi

2. Kết quả sau khi cấy chuyển lần 1

Sau khi được cấy chuyển lần 1, các tế bào tiếp tục phân chia và phát triển mạnh trong môi trường nuôi cấy. Sau 10 ngày tế bào mọc lan hết bề mặt đĩa 4 giếng và đạt mật độ cấy chuyển qua đĩa mới.

Khi nuôi cấy *in vitro*, các tế bào bám trên bề mặt đĩa đa phần có hình thoi thon dài, có nhân to hình cầu. Tiếp tục cấy chuyển khi tế bào mọc lan trên 80% diện tích của đĩa nuôi. Tế bào thu được sau trên 2 lần cấy chuyển là nguyên bào sợi có hình dạng là hình sao hoặc hình thoi, có nhân to hình cầu.



Hình 6. Tế bào sau 7 ngày cấy chuyển lần 1



Hình 7. Tế bào sau 10 ngày cấy chuyển lần 1

Như vậy, quần thể nguyên bào sợi thu được chứng tỏ đã nuôi cấy được tế bào sinh dưỡng của bào gắm trong môi trường DMEM 10% FBS, 1% non-essential amino acid để thu nhận số lượng lớn tế bào nhằm bảo tồn nguồn gen ở cấp độ tế bào, tạo nguyên liệu cho những nghiên cứu sâu hơn như chuyển nhân, tạo dòng vô tính...

Tiếp tục thử nghiệm thêm nhiều nồng độ huyết thanh khác để khảo sát nồng độ huyết thanh tối ưu cho sự phát triển tế bào bào gắm chúng tôi nhận thấy tốc độ phát triển và lan toả của tế bào bào gắm trong môi trường có bổ sung 15% FBS nhanh hơn so với chỉ bổ sung 10% (qua theo dõi được đánh giá mức độ +++ ở 10% FBS và ++++ ở 15% FBS).

3. So sánh tốc độ phát triển của tế bào mẫu tươi và đông lạnh

Mẫu mô đông lạnh trong nitơ lỏng -196°C được giải đông bằng phương pháp giải đông

nhẹ, cho mẫu vào ngay bể nước ấm 37°C trong thời gian 30 giây đến 1 phút sau đó tiến hành sát trùng và thực hiện các thao tác khác như mẫu tươi.

Chỉ tiêu theo dõi	Mẫu tươi	Mẫu đông lạnh
Khả năng bám dính	Ngày 3 +++	Ngày 3-4 ++
Tốc độ lan toả	Ngày 5-6 +++	Ngày 6-7 +++

Nhìn chung, cũng như kết quả nuôi cấy mẫu mô của bò rừng, bò tót thì khả năng bám dính và tốc độ lan toả tế bào của mẫu mô bảo quản tươi tốt hơn so với mẫu đông lạnh. Đối với mẫu tươi thì ở ngày nuôi thứ 3 mẫu mô đã bám dính vào đáy giếng nuôi, tỷ lệ mẫu bám dính là khoảng 80 - 85% và ngày thứ 5-6 quan sát thấy tế bào đã lan toả ra xung quanh. Đối với mẫu đông lạnh thì ngày thứ 3-4 mẫu mô bắt đầu bám vào đáy giếng nuôi nhưng mức độ bám dính còn chưa tốt, tỷ lệ các mẫu bám dính cũng chỉ 60 - 70%; quan sát thấy tế bào bắt đầu lan toả ở ngày 6-7.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bộ Khoa học, Công nghệ và Môi trường, 2000: Sách Đỏ Việt Nam, phần I: Động vật.

Nxb. Khoa học và Kỹ thuật Hà Nội.

- IUCN, 2004: Red List of threatened species.
- Chính phủ nước CHXHCN Việt Nam, 2002: Nghị định 48/2002/NĐ-CP về sửa đổi, bổ sung danh mục thực vật, động vật hoang dã quý hiếm ban hành theo NĐ 18/HĐBT ngày 17/01/2002 của Hội đồng Bộ trưởng.
- Lê Văn Ty và cs., 2003: Tạp chí Sinh học, 25(2): 1-6. Hà Nội.
- Fresney I. R., 1984: Culture of animal cells: A manual of basic technique. Aln R. Liss, Inc., New York.
- Frederick M. A., 2003: Current protocol in Molecular biology, chapter 28: Mammalian cell culture.

FIRST RESULTS OF COLLECT AND CULTURE OF *NEOFELIS NEBULOSA* SOMATIC CELLS

HOANG NGHIA SON, TRAN CAM TU, LE VAN TY

SUMMARY

The *Neofelis nebulosa* tissue was collected at Thao Cam Vien zoo park (Hochiminh city, Vietnam) and cultured at Institute of Tropical Biology's laboratory. According to the results of experiment, *Neofelis nebulosa* cells can growth well in the DMEM medium added 10 - 15% FBS and 1% non-essential amino acid. The growth rate of fresh tissue is better than the freezing tissue. Large number of typical fibroblasts was collected and conservation in nitrogen (-196°C) for the production of embryos of an endangered species (*Neofelis nebulosa*) in the future.

Ngày nhận bài: 23-11-2007