

## BƯỚC ĐẦU NGHIÊN CỨU TẠO PHÔI ĐỂ NHÂN BẢN BÒ TÓT (*BOS GAURUS*) BẰNG KỸ THUẬT CẤY NHÂN LÀM CƠ SỞ CHO VIỆC BẢO VỆ LOÀI ĐỘNG VẬT QUÝ HIẾM NÀY CỦA VIỆT NAM

LÊ VĂN TY, HOÀNG NGHĨA SON, NGUYỄN VĂN HẠNH  
NGUYỄN HỮU ĐỨC, BÙI XUÂN NGUYÊN

*Viện Công nghệ sinh học*

Hiện nay, phương pháp bảo vệ các loài động vật bị đe dọa tuyệt chủng trong điều kiện nuôi nhốt được tiến hành thông qua một loạt các chương trình nhân và giữ giống. Tuy nhiên, các chương trình này vẫn còn một số những hạn chế, trong đó có vấn đề không gian cần thiết cho động vật, vấn đề nuôi nhốt động vật hoang dã, sự mất khả năng sinh sản của động vật hoang dã trong điều kiện mới; ngoài ra, về mặt giá cả nuôi nhốt động vật hoang dã, cần có nguồn tài chính lớn, đây là một khó khăn đặc biệt đối với các nước đang phát triển. Những tiến bộ hiện nay trong kỹ thuật trợ giúp sinh sản như đông lạnh các giao tử, phôi, thụ tinh nhân tạo, cấy chuyển phôi cho phép tạo ra các phương pháp mới nhân đàn các loài động vật quý hiếm. Gần đây, kỹ thuật cấy nhân được đặc biệt quan tâm nhằm cứu vớt các loài động vật đang có nguy cơ bị tuyệt chủng và có thể tái tạo các loài đã tuyệt chủng nếu các mẫu tế bào còn nguyên vẹn. Khác với việc nhân bản các loài gia súc, đã sẵn sàng có nguồn trứng và mẹ nhận phôi, việc nhân bản động vật hoang dã đang có nguy cơ tuyệt chủng cao hoặc đã tuyệt chủng được biết đến với tên gọi là cấy nhân khác loài (interspecies nuclear transfer), trong đó sử dụng nguồn trứng và mẹ nhận loài họ hàng là điều không tránh khỏi.

Nhiều nghiên cứu in vitro khẳng định rằng các *ooplasts* (trứng đã loại nhân) của bò có khả năng tái thiết chương trình mã hóa trong nhân tế bào soma theo hướng tạo phôi đối với một số loài thú [1]. Khi cấy nhân tế bào của cừu, lợn khỉ, chuột vào *ooplast* của bò, kết quả là trong mọi trường hợp đều dẫn tới sự phồng lên của tế bào được gắn và các bước phân chia tiếp theo cho đến khi hình thành xoang của phôi nang

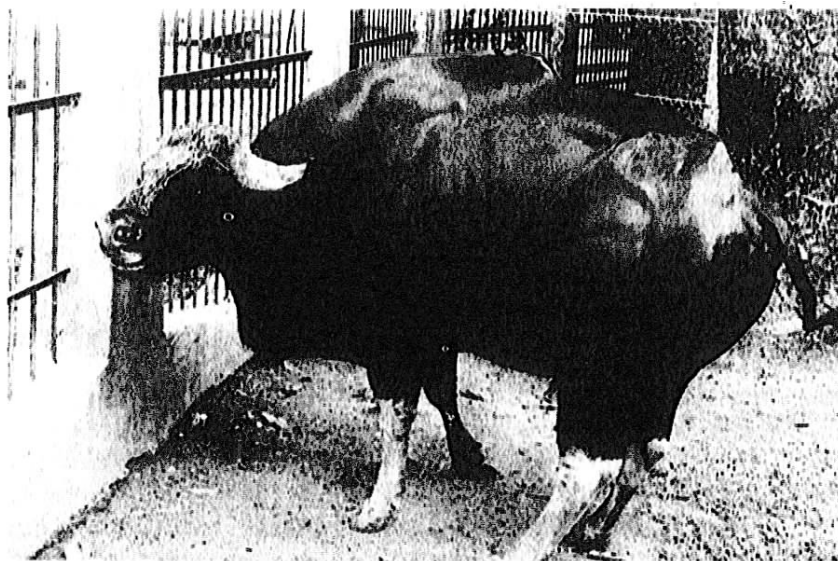
theo lịch trình tương tự như lịch trình phát triển phôi ở loài cho tế bào. Cấy nhân tế bào soma của người vào *ooplast* của bò cho thấy có sự phát triển tiếp tục các giai đoạn phôi [1]. Cấy nhân khác loài từ tế bào của cừu hoang dã (*Ovis ammon*) vào *ooplast* của cừu nhà (*Ovis aries*) đã tạo được phôi nang, cấy phôi vào cừu nhà cho dấu hiệu có chửa [1]. Cho đến nay việc tái tạo một động vật hoàn chỉnh bằng cấy nhân vào *ooplast* của động vật khác loài (xenogenic) vẫn còn là một thách thức, mà nguyên nhân chủ yếu là liệu bộ gen từ tế bào cho có tương thích với các ADN của ty thể *ooplast* và liệu sự tương thích này có đảm bảo duy trì sự phát triển bình thường của phôi và sự phát triển của bào thai hay không.

Cùng họ với bò nhà, bò tốt *Bos gaurus*, một loài động vật quý hiếm của nước ta (Sách đỏ Việt Nam, 1992) có đầy đủ tiêu chuẩn để thuần hoá, nuôi dưỡng, chọn lọc, lai tạo phục vụ các nhu cầu về thịt sữa của loài người. Nhìn toàn cục, bò tốt thật sự là con bài trùng, là động vật bảo hiểm tin cậy của bò nhà. Tuy vậy, cũng như nhiều loại động vật hoang dã khác, bò tốt đang đứng trước nguy cơ bị tuyệt chủng do diện tích sinh sống bị thu hẹp, các quần thể nhỏ lại bị phân cắt mạnh, ngoài ra săn bắn trái phép vẫn chưa kiểm soát được, thêm vào đó các tai nạn thiên nhiên như ngập lụt, cháy rừng cho thấy việc bảo vệ loài bò này trong các khu bảo tồn quốc gia là chưa đủ để khẳng định sự tồn tại và phát triển của loài bò này. Hiện tại, trong cả nước chỉ có một con bò tốt duy nhất đã trên 10 năm tuổi được nuôi nhốt tại Thảo cầm viên của thành phố Hồ Chí Minh (hình 1), Cho đến nay, vẫn chưa có một biện pháp khả thi nào để lưu giữ nguồn gen của loài động vật này.

Các kết quả gần đây của Phòng Công nghệ phôi, Viện Công nghệ sinh học trong việc bảo vệ các nguồn gen bằng nhân nuôi và đông lạnh tế bào của sao la, mang lớn, bò hà lan cao sản, bò sind, bò vàng bản địa (6; 8), cũng như các kết quả tạo phôi bò nhân bản đầu tiên, có thể xem như một tiền đề cho việc bảo vệ giống bò quý hiếm này. Ngoài ra, việc tạo phôi sao la (*Pseudoryx nghetinhensis*) phát triển nhiều ngày trong tử cung của bò, cũng như các kết quả trước đây về cấy nhân vào tế bào trứng khác loài (6), khả năng mang thai của bò nhà (*Bos taurus*) đối với phôi của bò tót (*Bos gaurus*) [2] đã gợi ý

có thể bảo vệ loài bò tót thông qua việc tạo phôi bằng cấy nhân tế bào soma của bò tót vào ooplast của bò nhà là bước trước mắt và bước tiếp theo là cấy phôi này vào bò nhà.

Trong phần trình bày này, chúng tôi tập trung vào giải quyết các vấn đề: Nhân và bảo quản đông lạnh nguồn sợi bào (fibroblast) của bò tót nhằm bảo vệ khẩn cấp nguồn gen duy nhất hiện có trong điều kiện nuôi nhốt ở nước ta; thăm dò khả năng tạo phôi của bò tót bằng cấy nhân tế bào của bò tót vào ooplast của bò nhà.



Hình 1. Con bò tót duy nhất được nuôi nhốt tại Thảo cầm viên của thành phố Hồ Chí Minh (đã trên 10 năm tuổi)

## I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 1. Chuẩn bị tế bào

Mảnh da tai bò tót được thu từ Thảo cầm viên của thành phố Hồ Chí Minh vào ngày 5.12.2001, được bảo quản trong nitơ lỏng và trong dung dịch sinh lý ở nhiệt độ thấp; cùng ngày được chuyển tới phòng thí nghiệm của Viện CNSH, được giải đông, xử lý trypsin và nhân nuôi trong môi trường DMEM trong đĩa 4 lỗ, trong tủ nuôi 39°C, 5% CO<sub>2</sub> trong không khí, có bão hòa hơi nước. Khi tế bào nuôi đạt mật độ tối ưu thì chuyển vào nuôi trong các bình nuôi 5×5 cm. Cấy chuyển sau 4 ngày. Tế bào thu được bảo quản trong nitơ lỏng, sau khi được xử lý với

chất chống đông DMSO 10%.

Tế bào dùng để cấy nhân được nuôi trong môi trường nghèo dinh dưỡng, được tính toán đồng pha với trứng nhận.

### 2. Chuẩn bị trứng

Buồng trứng bò được thu từ lò mổ, bảo quản trong dung dịch NaCl 0,9% có bổ sung chất kháng sinh, ở nhiệt độ 30-35°C, được đưa về phòng thí nghiệm trong vòng 2-3 giờ. Trước khi thu trứng, buồng trứng được rửa vài lần bằng nước muối sinh lý. Hút trứng từ các nang có đường kính từ 2 đến 5 mm bằng một xy lanh 10 cc với kim số 18, trong dung dịch 199-HEPES. Các trứng được rửa vài lần cũng bằng dung dịch trên; tại đây trứng được phân loại dựa trên cơ sở

mức độ nguyên vẹn của lớp tế bào cận noãn, sau đó được chuyển vào dung dịch nuôi có bổ sung huyết thanh thai bê (HTTB). Các trứng loại A, B được đưa vào nuôi 9-10 trứng trong giọt 50  $\mu$ l hoặc nuôi tách rời 1 trứng trong 20  $\mu$ l dung dịch nuôi có phủ dầu, thời gian từ 22 đến 24 giờ trong điều kiện 39°C, 5% CO<sub>2</sub> trong không khí bão hòa hơi nước.

Trứng thuần thực được loại bỏ tế bào cận trứng bằng cách hút qua đầu pipet thích hợp, sau khi đã xử lý với enzym hyaluronidaza 0,1%. Các trứng đẹp có thể cực được chọn để loại nhân. Trứng được loại nhân (ooplast) làm nguyên liệu để tiến hành cấy nhân.

### 3. Cấy nhân và hoạt hóa tổ hợp nhân-ooplast

Các ooplasts được bảo quản trong giọt 199-HEPES dùng để cấy nhân, có phủ dầu. Tế bào của bò tót được làm tươi bằng cách xử lý với trypsin 0,25% trong 9 phút, trung hòa bằng DMEM 10% FBS, rồi cấy trực tiếp vào ooplast bằng bộ vi thao tác có kim tiêm đường kính 10-12  $\mu$ m. Các tổ hợp này được hoạt hóa bằng xung điện ở điện thế 1,0-2,0 kV/cm trong 50 đến 100

ms trong buồng xung điện thích hợp, được tiếp tục nuôi trong dung dịch hoạt hóa 4 đến 5 giờ, sau đó chuyển qua môi trường nuôi phôi có bổ sung tế bào [7]. Phôi phát triển đến các giai đoạn 2 tế bào, 8 tế bào, phôi dâu, phôi nang được ghi nhận và kiểm tra số lượng tế bào, thể nhiễm sắc.

## II. KẾT QUẢ NGHIÊN CỨU

### 1. Nhân nuôi và bảo quản tế bào của bò tót

Trong trường hợp nuôi các mảnh da bò tót, tế bào bắt đầu loang ra xung quanh vào ngày thứ 5 sau khi nuôi cấy, thông thường khoảng 10-11 ngày sau cho lần cấy chuyển đầu tiên (hình 2). Từ các lần cấy chuyển thứ 2 trở đi, sau 3 ngày nuôi cấy, tế bào đạt mật độ cực đại. Giống như nhân nuôi các loại tế bào động vật khác như: sao la, gấu, bò nhà..., sự phân chia của tế bào bò tót có dạng hàm số mũ đặc trưng. Thời gian đạt cực đại trong các lần cấy chuyển nhắc lại là 3 ngày (khảo sát đến lần cấy chuyển thứ 19), chứng tỏ mức ổn định của tế bào trong nuôi cấy.



ình 2. Tế bào bắt đầu loang ra sau 5 ngày nuôi cấy

Bảo quản tế bào bằng phương pháp đông lạnh theo quy trình đông lạnh chậm với chất chống đông 10% DMSO, cũng như đông lạnh nhanh có bổ sung đường sucroza 1 M, cho kết quả đạt tỷ lệ sống trên 70% đối với sợi bào (fibroblast), nhưng chỉ đạt 30% đối với tế bào

mô liên kết; điều đó cho thấy các loại tế bào khác nhau của cùng một con vật cần có một chế độ đông lạnh khác nhau.

Kết quả khảo sát bộ thể nhiễm sắc cho thấy ở các lần cấy chuyển cao, bộ thể nhiễm sắc ổn

định về mặt số lượng và hình thái (hình 3), chứng tỏ việc nhân nuôi không làm biến đổi tính

chất của tế bào, đảm bảo sự toàn vẹn của tế bào trong nuôi cấy.



Hình 3. Chromosom của tế bào bò tốt sau lần cấy chuyển thứ 6

## 2. Kết quả nuôi trứng chín

Trong môi trường nuôi 199 10% FBS có bổ sung các hooc-môn sinh sản như FSH, LH và estradiol-17 $\beta$ , tỷ lệ trứng chín đánh giá theo tỷ lệ có hình thành cực cấu sau khi đã loại hết các tế bào cận noãn đạt 58-70%, trong khi đó trong điều kiện tương tự không bổ sung hooc môn, tỷ lệ trứng chín chỉ đạt 12-18%. Tăng liều estradiol đến 3  $\mu\text{g}/\text{ml}$  làm gia tăng hình thành cực cấu, trong khi đó nuôi 10 tổ hợp noãn-tế bào cận trứng trong giọt 50 $\mu\text{l}$  dung dịch, hoặc nuôi tách rời từng tổ hợp trong mỗi giọt 20 $\mu\text{l}$ , không thấy có sự sai khác có ý nghĩa về tỷ lệ thuận thực của trứng.

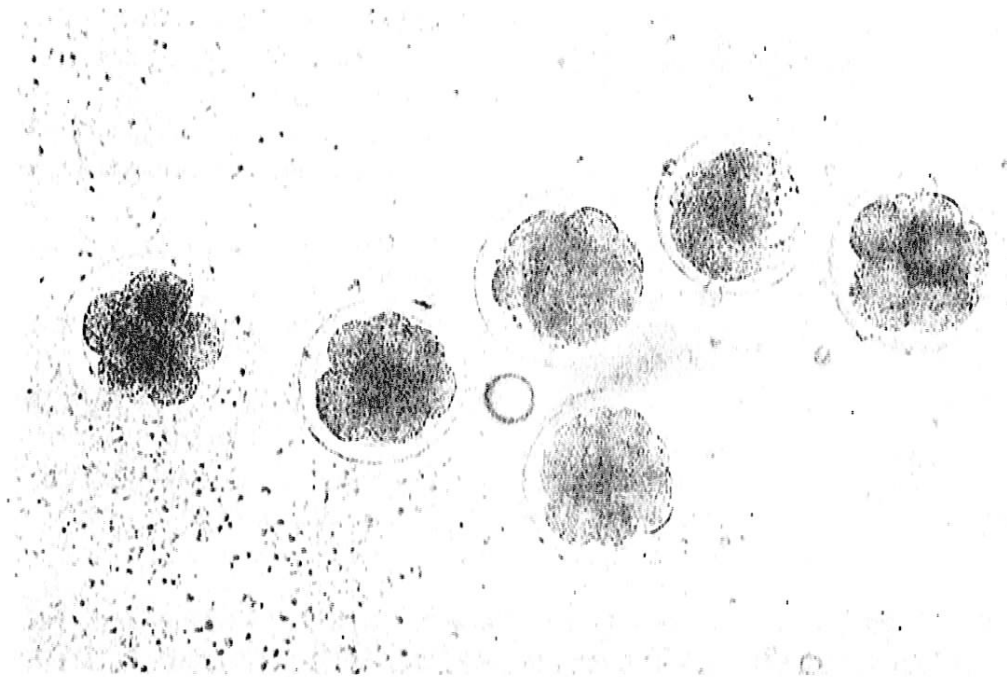
## 3. Kết quả tạo phôi bằng cấy nhân

Bảng dưới đây so sánh sự phát triển của phôi sau khi tiến hành cấy nhân và xung điện giữa phôi được tạo ra từ cấy nhân của tế bào bò nhà và phôi từ cấy nhân của tế bào bò tốt vào ooplast của trứng bò nhà. Điểm nổi bật là không có sự sai khác về lịch trình phát triển từ lúc xung điện cho đến khi tạo thành phôi nang giữa hai loại phôi này. Tỷ lệ phôi nang tạo ra ở cả hai loại phôi khác nhau không có ý nghĩa. Ở cả hai loại phôi, đều quan sát thấy phôi chui ra khỏi màng pellucit vào ngày thứ 9, trong môi trường B2 10% FBS có bổ sung tế bào vero hoặc tế bào đệm (hình 4).

Bảng

So sánh kết quả cấy nhân của tế bào bò hà-ấn và tế bào bò tốt

Lô thí nghiệm	n	Số ooplast sử dụng	Số ooplast gắn nhân (%)	Số phôi 2 tế bào (%)	Số phôi đầu + phôi nang (%)
1. Cấy nhân của tế bào bò hà-ấn vào ooplast của bò vàng Việt Nam	5	160	124 (77,5)	96 (60)	14 (9)
2. Cấy nhân của tế bào bò tốt vào ooplast của bò vàng Việt Nam	5	271	195 (72,0)	112 (41)	20 (7,4)



Hình 4. Phôi của bò tốt phát triển đến giai đoạn phôi dâu, phôi nang.

### III. THẢO LUẬN

Từ một mẫu tế bào của tai bò tốt thu ngày 5-12-2001, hiện nay chúng tôi đã tạo được số lượng tế bào đủ để bảo quản nguồn gen của con vật này trong nitơ lỏng. Vậy là ngay cả khi con vật này chết đi, chúng ta vẫn có nguyên liệu để tái tạo lại các phiên bản. Với phương pháp bảo quản và nhân nuôi tế bào như hiện nay, qua khảo sát đến lần cấy chuyển thứ 19, cho thấy tốc độ phân bào của tế bào bò tốt là ổn định: tế bào đạt mật độ tối ưu sau 3 ngày, giống như quan sát thấy ở bò nhà. Bộ thể nhiễm sắc qua các lần cấy chuyển, ổn định về mặt số lượng ( $2n=58$ ) và về mặt hình thái (hình 2). Những quan sát này bước đầu cho phép kết luận về khả năng toàn vẹn của tế bào. Bảo quản bằng đông lạnh và cấy chuyển là phương pháp song hành với phương pháp bảo tồn trong các vườn quốc gia và là phương pháp có nhiều ưu thế: tiện lợi, rẻ tiền và cần thiết như đã trình bày trong phần mở đầu. Từ việc bảo quản thành công tế bào bò tốt, có thể mở rộng để bảo vệ các loài thú hoang dã khác có nguy cơ bị tuyệt chủng hoặc các nguồn gen quý hiếm ở các loài động vật nuôi, tạo cơ sở để thành lập

ngân hàng bảo quản đông lạnh các loài động vật quý hiếm của nước ta, cũng như trao đổi nguồn gen giữa các cơ quan nghiên cứu trong và ngoài nước.

Kết quả cấy nhân cho thấy tỷ lệ gắn ở cả hai trường hợp đều đạt từ 72-75%, tỷ lệ phôi 2 tế bào đạt 41-60%, tỷ lệ phôi phát triển đến giai đoạn phôi nang từ 7,4-9%, thấp hơn so với kết quả cấy nhân hiện nay [3, 8]; nguyên nhân có thể do tỷ lệ gắn kết sau khi xung điện còn thấp, tuy nhiên không có sự sai khác đáng kể trong trường hợp cấy nhân cùng loài (bò nuôi vào bò nuôi) hoặc cấy nhân khác loài (bò tốt vào bò nuôi). Điều đặc biệt quan trọng là lịch trình phát triển của phôi trong hai thí nghiệm tương tự nhau, chứng tỏ ooplasm của bò nhà có thể dung nạp nhân tế bào của bò tốt, cũng như đã dung nạp nhân các tế bào của chuột, khỉ, dê... và ngay cả đối với tế bào của người [1]. Tỷ lệ phát triển của phôi đến các giai đoạn khác nhau là tương tự trong hai trường hợp, chứng tỏ sự khác nhau về loài giữa hai loài bò ở giai đoạn này chưa bộc lộ. Mặc dù cấy nhân tế bào của bò tốt vào trứng của bò nuôi, phôi thai đã có thể phát triển đến 202 ngày [1], tuy nhiên khi cấy chuyển phôi bò

tốt thụ tinh trong ống nghiệm vào bò hà-lan, bê con sinh ra nhưng chết sau vài giờ, còn bò mẹ nhận giảm lượng sữa do các phản ứng miễn dịch [2]. Miễn dịch giữa hai loài chắc chắn là một thách thức cho việc tạo ra bò tốt nhân bản hoàn chỉnh. Mặc dù phải khắc phục vấn đề miễn dịch do khác loài, mô hình cấy nhân của bò tốt vào bò nhà chắc chắn là mô hình lý tưởng để nhân bản loài động vật quý hiếm có nguy cơ tuyệt chủng này.

Để Việt hóa thuật ngữ *ooplast* (tiếng Anh), chúng tôi đề nghị dùng thuật ngữ *noãn nguyên*, được hiểu là trứng đã thuận thực được loại bỏ nhân, một thuật ngữ sẽ dùng phổ biến trong kỹ thuật cấy nhân.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Lanza R. P. et al., 2000: Cloning, 2 (2): 79-96.
2. Hammer C. J. et al., 2001: Theriogenology, 55: 1447-1455.
3. Shiga K. et al., 1999: Theriogenology, 52: 527-535.
4. Bộ Khoa học, Công nghệ và Môi trường, 1992: Sách Đỏ Việt Nam; phần động vật, 1: 85-86.
5. Le Van Ty et al., 2001: Theriogenology, 55: 406.
6. Nguyễn B. X. et al., 2000: Theriogenology, 53 (1): 235.
7. Lê Văn Ty và cs., 1998: Kỷ yếu Viện Công Nghệ sinh học, 175-180.
8. Bùi Xuân Nguyên và cs., 2000: Tạp chí Sinh học, 22(1): 16-20.

### PRODUCTION OF EMBRYOS OF AN ENDANGERED SPECIES (*BOS GAURUS*) BY THE XENOGENIC NUCLEAR TRANSFER INTO THE OOPLAST OF THE DOMESTIC COW FOR PRESERVATION OF THIS ANIMAL IN VIETNAM

LE VAN TY, HOANG NGHIA SON, NGUYEN VAN HANH, NGUYEN HUU DUC, BUI XUAN NGUYEN

#### SUMMARY

Advanced reproductive technologies, including in vitro fertilization, nuclear transfer and embryo transfer are becoming increasingly important for the preservation of endangered animal species. The goal of this investigation is to preserve the somatic cell of the unique bull of *Bos gaurus* captured in Vietnam (Zoo park of Hochiminh city) and to use this cell as nuclear donor, transferred into xenogenic ooplasts from matured oocytes of domestic cattle (*Bos indicus*).

The *Bos gaurus* ear fibroblast cell culture, freezing and thawing until the 19th passage shown their totipotency to develop in vitro: the characteristic behaviour of multiplication, the stability of number and morphology of chromosomes, the capability to be activated by ooplast and developed into blastocyst.

The comparison of reconstructed embryos of *Bos gaurus* and *Bos indicus* cells with the ooplast from the later presented the similarity for all steps the development: the rate of cleavage was from 41-60%, the percentage of the embryos developed into blastocytes was approximately 10% of used oocytes, the hatching was observed in both case at 9th day.

In conclusion, the techniques of culture and freezing were satisfied for the cryoconservation of tissues and cells of endangered wild animals and ooplasts from matured oocyte of domestic cattle could not only harbor the progeny of *Bos gaurus*, but activate the nuclei of its cell to produce embryos until blastocyst.

Ngày nhận bài: 15-7-2002