

TẠO PHÔI BÒ BẰNG KỸ THUẬT THỤ TINH *IN VITRO* TỪ NGUỒN GIAO TỬ ĐÔNG LẠNH

Nguyễn Thị Thương Huyền^{2,1}, Phạm Văn Phúc¹, Hoàng Nghĩa Sơn³, Phan Kim Ngọc¹

¹Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, thành phố Hồ Chí Minh

²Trường Đại học Sư phạm, thành phố Hồ Chí Minh

³Viện Sinh học nhiệt đới

TÓM TẮT

Đề tài tiến hành nhằm nghiên cứu việc bảo quản tế bào trứng bò trưởng thành bằng phương pháp thụ tinh hóa, đồng thời tạo phôi từ nguồn giao tử này bằng phương pháp thụ tinh trong ống nghiệm. Thu nhận tế bào trứng từ buồng trứng của bò cái bị giết mổ bằng phương pháp chọc hút. Những tế bào trứng có ít nhất từ 3 lớp cumulus và đồng nhất về tế bào chất được chọn để nuôi chín trong môi trường C₁ (TCM-199, 10% FBS, 10 ng EGF, 0,2 mM Na pyruvate, 50 µg/ml gentamicin) ở 38,5°C và 5% CO₂, hơi nước bão hòa. Sau 22 - 24 h nuôi cấy, chọn những tế bào trứng chín theo quan sát hình thái đem bảo quản bằng phương pháp thụ tinh hóa trong cọng rạ qua 2 bước: trứng được cho vào dung dịch cân bằng VS₁ (TCM-199 + 10% FBS + 10% DMSO + 10% EG) để trong 45 giây, tiếp theo cho vào dung dịch thụ tinh hóa VS₂ (TCM-199 + 10% FBS + 20% DMSO + 20% EG + 1 M sucrose) để trong 25 giây, sau đó nạp từ 5 - 7 tế bào trứng vào cọng rạ (0,25 ml) và nhúng trực tiếp vào nitrogen lỏng (khoảng 25 - 40 giây kể từ khi trứng tiếp xúc với dung dịch bảo quản). Giải đông tế bào trứng như sau: (i) lấy cọng rạ chứa tế bào trứng ra khỏi bình nitrogen lỏng và để trong không khí 5 giây, nhúng vào nước ấm 37°C trong 10 giây, sau đó chuyển tế bào trứng vào đĩa nhựa trong (Φ35); (ii) Các tế bào trứng lần lượt được chuyển qua môi trường rửa đông thứ nhất (RD₁: TCM-199 + 10% FBS + 0,25 M sucrose) trong 1,5 phút, RD₂ (TCM-199 + 10% FBS + 0,15 M sucrose) khoảng 1,5 phút và RD₃ (TCM-199 + 10% FBS) trong 5 phút; (iii) Tiếp tục chuyển tế bào trứng qua môi trường C₁ trong khoảng 3 phút. Quá trình giải đông tiến hành ở nhiệt độ phòng (25°C). Chọn những trứng còn nguyên vẹn về hình thái đem thụ tinh trong ống nghiệm. Kết quả được 2658/3276 tế bào trứng đạt đến giai đoạn thành thực (81,19 ± 2,75%). 76,08% tế bào trứng còn nguyên vẹn sau giải đông (theo quan sát hình thái); Tỷ lệ thụ tinh (phôi 2 tế bào) đạt 11,67% và có 46/144 phôi phát triển đến giai đoạn phôi nang.

Từ khóa: Bảo quản lạnh, tế bào trứng bò, thụ tinh trong ống nghiệm, thụ tinh hóa

MỞ ĐẦU

Công nghệ hỗ trợ sinh sản nói chung và kỹ thuật thụ tinh trong ống nghiệm (*In Vitro Fertilization* - IVF), đông lạnh nói riêng hiện đang được quan tâm bởi tính thực tiễn của nó. Đông lạnh tế bào trứng giúp bảo quản, dự trữ vật chất di truyền trong thời gian dài, từ đó giúp ta chủ động trong việc điều khiển sản xuất con giống theo ý muốn. Ngoài ra, việc trao đổi, mua bán gia súc dưới dạng tế bào trứng đông lạnh an toàn về dịch bệnh, dễ vận chuyển và tạo điều kiện cho gia súc thích nghi với điều kiện sống.

Xuất phát từ một nước nông nghiệp, Việt Nam chúng ta có thể nhân nhanh số lượng lớn đàn giống cao sản hoặc chọn lọc các cá thể chất lượng cao thông qua việc sử dụng trứng và tinh trùng chất lượng tốt. Hiện nay, ở nước ta có rất nhiều công trình và dự án về nhân nhanh số lượng và chất lượng đàn

gia súc, song chưa có công trình nào công bố về tỷ lệ kết quả thụ tinh trong ống nghiệm từ nguồn tế bào trứng bò đông lạnh. Vì vậy, chúng tôi tiến hành thí nghiệm nhằm mục tiêu thử nghiệm quy trình và đánh giá hiệu quả quy trình bảo quản tế bào trứng bò bằng phương pháp thụ tinh hóa. Sự thành công của thí nghiệm sẽ làm cơ sở tạo ngân hàng tế bào trứng phục vụ cho sản xuất con giống và các nghiên cứu cơ bản: xác định giới tính phôi, chuyển gen, nhân bản, bảo quản nguồn gen... Đồng thời, đề tài còn góp phần vào việc nâng cao hiệu quả kinh tế cho ngành chăn nuôi.

Đông lạnh tế bào trứng đã được nghiên cứu ứng dụng ở nhiều nước trên thế giới. Tuy nhiên, khác với phôi và các loại tế bào khác, tế bào trứng rất khó bảo quản, và tỷ lệ phát triển đến giai đoạn blastocyst thu được rất thấp sau khi giải đông, thụ tinh trong ống nghiệm. Nguyên nhân chủ yếu có lẽ do kích thước của tế bào trứng bò lớn, nên tỷ lệ thể tích bề mặt

thấp, chính điều này gây khó khăn đối với nước và các chất bảo quản lạnh di chuyển qua các màng bào tương (cell plasma). Do đó, những thử nghiệm ban đầu - các kỹ thuật thủy tinh hóa mới về sự bảo quản lạnh tế bào trứng bò đã được tiến hành (Martino *et al.*, 1996; Vajta *et al.*, 1998). Những nghiên cứu trước đây đã thử nghiệm phương pháp thủy tinh hóa với cọng rạ hồ (Vajta *et al.*, 1998), dùng chất bảo quản lạnh là EG (Ethylene Glycol) và DMSO (Dimethyl sulfoxide) để bảo quản tế bào trứng bò, vì vậy phương pháp này thu được tỷ lệ sống sau giải đông và tỷ lệ phát triển tiếp theo của phôi cao hơn so với các phương pháp đông lạnh chậm thông thường. Chúng tôi tiến hành thí nghiệm phạm vi ảnh hưởng về sự bất thường của nhiễm sắc thể và thoi vô sắc sau khi giải đông đối với tế bào trứng bò trưởng thành đã được thủy tinh hóa.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Đối tượng nghiên cứu

Tế bào trứng bò thu nhận từ buồng trứng của bò cái giết mổ ở lò mổ của Công ty Kỹ nghệ súc sản Vissan.

Tinh trùng bò đông lạnh nhập ngoại giống tốt, được mua tại Trung tâm Chuyển giao Khoa học kỹ thuật, Viện Chăn nuôi.

Thu nhận trứng

Buồng trứng thu nhận từ lò mổ, để trong nước muối sinh lý 0,9% (có bổ sung kháng sinh), chuyển nhanh về phòng thí nghiệm (PTN). Tại PTN, lọ mẫu buồng trứng được lau sạch bằng cồn 70°, rửa sạch máu, mỡ và chuyển vào tủ cấy vô trùng. Dùng kẹp vô trùng chuyển mẫu ra khay, rửa buồng trứng từ 2 đến 3 lần bằng dung dịch NaCl 0,9% bổ sung kháng sinh đã làm ấm 37°C. Cho buồng trứng vào đĩa Petri Φ90 có chứa NaCl 0,9% bổ sung kháng sinh được làm ấm 37°C để giữ mẫu.

Thu nhận tế bào trứng bằng phương pháp chọc hút: Sử dụng đầu kim 18G gắn vào syringe 5ml hút khoảng 1 ml dung dịch D -PBS có kháng sinh đã làm ấm. Đâm mũi kim vào các nang có đường kính từ 2 - 8 mm, hút dịch nang cho đến khi được khoảng 3 ml thì chuyển dịch vào đĩa petri nhựa Φ60 và các đĩa chứa dịch nang trứng được chuyển vào tủ ấm 38,5°C từ 5 - 10 phút để lắng. Sau đó soi tìm và phân loại tế bào trứng dưới kính hiển vi soi ngược (hoặc kính hiển vi soi nổi) ở độ phóng đại 40 lần.

Nuôi chín tế bào trứng (*In vitro* Maturation -IVM)

Chọn những tế bào trứng có từ 2 đến 3 lớp cumulus trở lên (Hình 1A) rửa 4 lần trong dung dịch DPBS, rửa trong 2 lần môi trường IVF Flushing (Vitrolife, Thụy Điển), rửa trong môi trường C₁ và cuối cùng chuyển vào trường C₁ (TCM-199 bổ sung 10% FBS, 10 ng EGF, 0,2 mM Na pyruvate, 50 µg/ml gentamicin) nuôi trong điều kiện 38,5°C và 5% CO₂, hơi nước bão hòa (nuôi trong 22 - 24 h).

Đông lạnh trứng

Quy trình đông lạnh dựa theo protocol của Otoi và đồng tác giả (19980 và của Kim Dong - Hoon và đồng tác giả (2007), có cải tiến. Sau 22 - 24 h nuôi, chọn những tế bào trứng chín (lớp cumulus giãn nở rộng) đem đông lạnh theo phương pháp thủy tinh hóa, cân bằng trong môi trường chống đông 2 bước: Tế bào trứng được cân bằng 45 giây trong môi trường VS₁ (TCM-199 + 10% FBS + 10% DMSO + 10% EG), sau đó chuyển qua môi trường thủy tinh hóa VS₂ (VS₂ = TCM-199 + 10% FBS + 20% DMSO + 20% EG +1 M sucrose) trong 25 giây. Cuối cùng chuyển trứng vào cọng rạ (straw) loại có dung tích 0,25 ml (I.M.V, Pháp) trong vòng 30 giây.

Cách chuyển tế bào trứng vào cọng rạ như sau: hút 1 khoảng môi trường VS₂, sau đó hút một khoảng đệm khí, hút tiếp một đoạn môi trường VS₂ rồi dùng mouth pipette chuyển các tế bào trứng vào (5 - 7 tế bào trứng/cọng rạ), hút thêm khoảng đệm khí, cuối cùng hút thêm một đoạn môi trường VS₂ và hàn đầu cọng rạ bằng máy ép nhựa. Đưa thẳng cọng rạ vào bình nitrogen lỏng (thao tác nhanh). Trên mỗi cọng rạ ghi số lượng tế bào trứng, ngày đông lạnh.

Giải đông trứng

Trứng được giải đông theo phương pháp 3 bước: lấy cọng rạ chứa tế bào trứng ra khỏi bình nitrogen lỏng, để trong không khí 5 giây, nhúng vào nước ấm 33 - 35°C, chuyển các tế bào trứng lần lượt vào đĩa chứa môi trường RĐ₁ (TCM-199 + 10% FBS + 0,25 M sucrose) trong khoảng 1,5 môi trường RĐ₂ (TCM-199 + 10% FBS + 0,15 M sucrose) cũng trong khoảng 1,5 phút, môi trường RĐ₃ (TCM-199 + 10% FBS) trong 5 phút, cuối cùng chuyển vào môi trường C₁ để trong tủ ấm 38,5°C và 5% CO₂ trong 2 - 3 h để giúp tế bào trứng phục hồi hoàn toàn trước khi đánh giá sự hình thái của tế bào trứng trước khi làm thụ tinh *in vitro*.

Chuẩn bị tinh trùng

Lấy cọng rạ chứa tinh từ bình nitrogen lỏng, để

trong khí 5 giây rồi cho vào bể ổn nhiệt ở nhiệt độ 35 - 37° C trong 30 - 40 giây. Tình trạng sau khi giải đông được pha loãng và hoạt hóa trong môi trường BO bổ sung sodium caffeine benzoate 0,3885 mg/ml và heparin 4 µl/ml, sau đó ly tâm lần thứ nhất 1800 vòng/phút trong 5 phút, hút bỏ phần trên, để lại phần dưới đáy khoảng 0,5 ml và huyền phù dịch này. Tiếp theo tiến hành ly tâm lần hai với tốc độ và thời gian như lần một, phần lắng dưới đáy ống falcon được pha loãng bằng môi trường BO sao cho đạt mật độ 5 - 6.10⁶ tinh trùng/ml. Dịch huyền phù này dùng để tạo vi giọt thụ tinh trong đĩa 4 giếng (100 µl/giọt), phủ dầu khoáng, giữ trong tủ ấm 38,5°C, 5% CO₂. Như vậy, mỗi vi giọt chứa khoảng 5 - 6.10⁵ tinh trùng. Lượng tinh trùng này được sử dụng cho thụ tinh 15 - 20 trứng trong một vi giọt. Nghĩa là cần khoảng 25 đến 30 ngàn tinh trùng để thụ tinh cho 1 trứng.

Thụ tinh trong ống nghiệm và nuôi phôi

Chuyển 15 - 20 tế bào trứng đã IVM vào mỗi vi giọt thụ tinh (có sẵn tinh trùng) trong đĩa 35mm có phủ dầu khoáng. Lưu ý, khi chuyển tế bào trứng, hút càng ít lượng môi trường nuôi trứng kèm theo thì càng tốt. Đặt đĩa trên vào tủ nuôi ở 38,5°C; 5% CO₂ trong 5 - 6 h. Sau khi thụ tinh 5 - 6 h thụ tinh, các tế bào trứng được loại bỏ cumulus bằng pipette có gắn pipette pasteur. Các hợp tử giả định được chuyển vào các vi giọt môi trường CR1aa, đĩa nuôi được phủ dầu khoáng và nuôi ở 38,5°C; 5% CO₂. Quan sát định kỳ

trong vòng 8 ngày nuôi, ghi nhận số lượng phôi và các giai đoạn phát triển.

Xử lý số liệu

Số liệu thu nhận được xử lý bằng phần mềm Excel, tính toán thống kê ở độ tin cậy 95%, hàm Descriptive Statistics.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Kết quả nuôi trứng chín (*In Vitro maturation_ IVM*)

Sau 20 - 24 h nuôi, tế bào trứng được phá cumulus bằng enzyme hyaluronidase 0,1% rồi đánh giá dựa vào sự hiện diện của thể cực thứ nhất và độ đồng đều của tế bào chất (Hình 1B; 1C). Kết quả thể hiện trong bảng 1.

Có tổng cộng 3154 tế bào trứng đem nuôi, thu được tỷ lệ trưởng thành là 81,19 ± 2,75%. Kết quả này cao hơn công bố của tác giả Nguyễn Thị Ước và đồng tác giả (2003; 65,61%), của Nguyễn Văn Lý (2006; 76,83%); và thấp hơn các kết quả công bố ngoài nước: Lonergan Pat và đồng tác giả (1996; 87 - 96%), Edwards và đồng tác giả (2005; 83,9%). Kết quả này đã phần nào khẳng định sự thành công trong việc nuôi chín tế bào trứng trong ống nghiệm của nhóm nghiên cứu.

Bảng 1. Kết quả nuôi tế bào trứng.

Số đợt thí nghiệm	Tổng số tế bào trứng đem nuôi	Số tế bào trứng trưởng thành	Tỷ lệ tế bào trứng trưởng thành
15	3276	2658	81,19 ± 2,75%

α < 0,05

Kết quả đông lạnh tế bào trứng

Các tế bào trứng thành thực (dựa vào độ giãn nở của cumulus) được bảo quản bằng phương pháp thủy tinh hóa, sau đó giải đông và đánh giá sự toàn vẹn về mặt hình thái dưới kính hiển vi soi ngược. Kết quả thể hiện ở bảng 2.

Bảng 2 cho thấy, số lượng tế bào trứng thu được sau giải đông đạt tỷ lệ 82,43 ± 3,18% (1776/2155 trứng), khẳng định rằng sau khi đông lạnh, khả năng thu hồi lại được số lượng tế bào trứng là rất cao và số

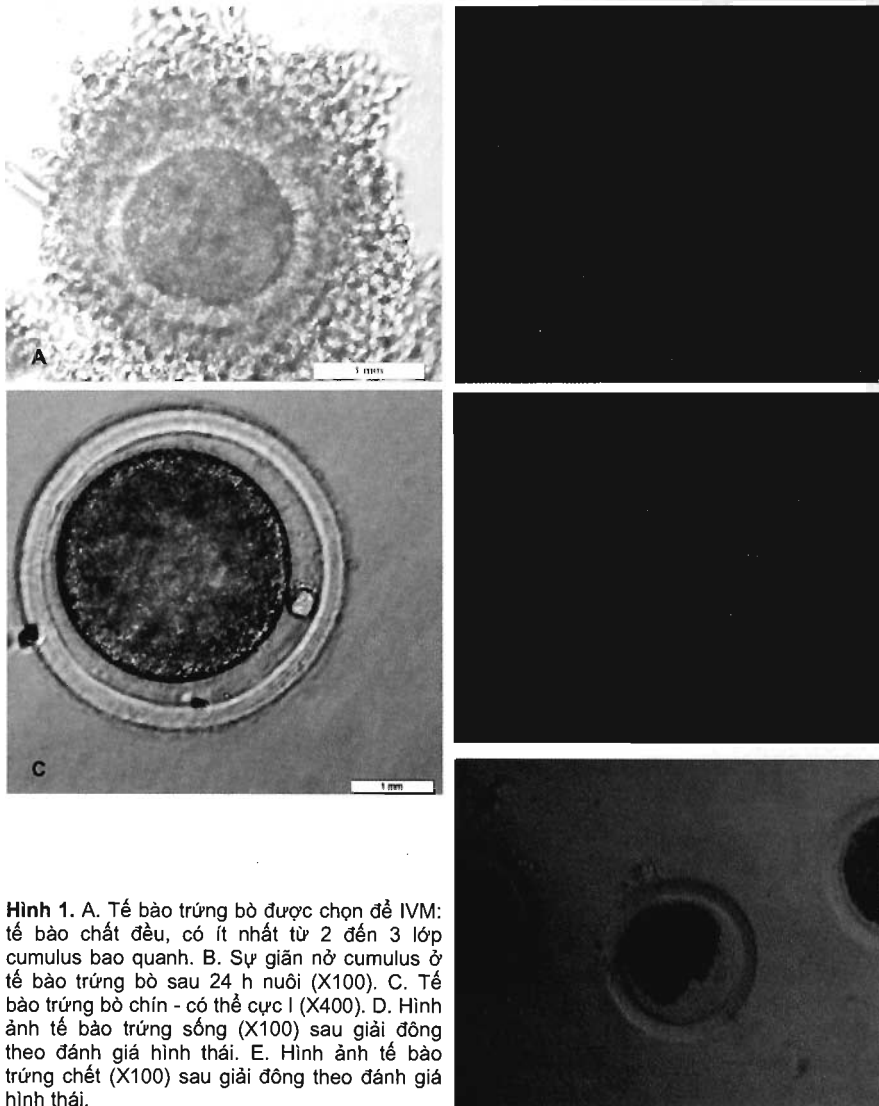
tế bào trứng mất trong quá trình bảo quản và giải đông là không đáng kể. Tỷ lệ trung bình tế bào trứng nguyên vẹn về mặt hình thái so với tổng số tế bào trứng thu được sau giải đông là 76,08 ± 7,42%. Kết quả này còn thấp hơn nhiều so với kết quả của Otoi (1998), Asada (2002), Men và đồng tác giả (2002), đặc biệt là kết quả của Chian và đồng tác giả (2004) khi dùng chất bảo quản lạnh là 15% EG kết hợp với 15% DMSO, và khi dùng 15% EG kết hợp với 15% PG.

Có nhiều nguyên nhân dẫn đến tỷ lệ sống sau giải đông thấp như vậy. Bao gồm các nguyên nhân

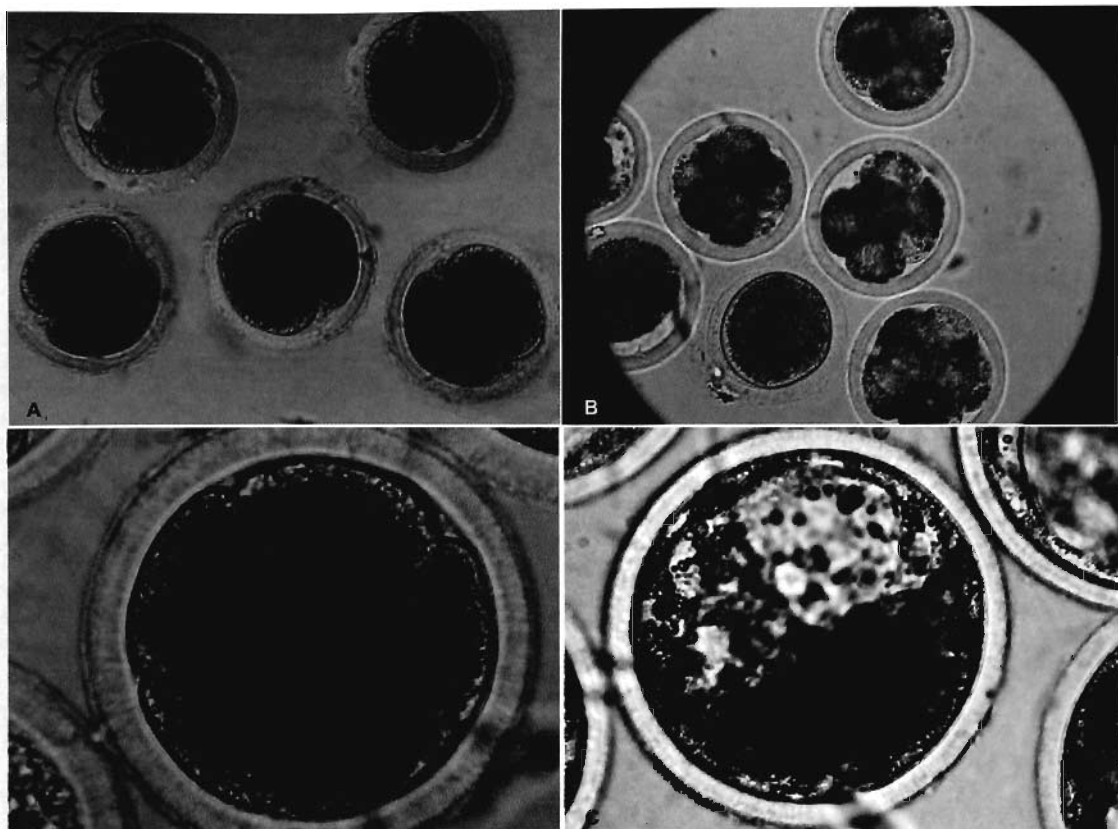
về kỹ thuật thao tác thực hiện kể từ khi bắt đầu tiến hành đông lạnh đến khi giải đông, thao tác chuyển trứng qua các môi trường đông lạnh (VS_1 trong 45 giây, VS_2 trong 25 giây) còn chậm không đảm bảo yêu cầu về mặt thời gian làm cho trứng tiếp xúc với các chất bảo quản lạnh quá lâu và không đảm bảo về nhiệt độ có thể là một trong những nguyên nhân ảnh hưởng đến khả năng sống của trứng sau giải đông. Ngoài ra còn có một nguyên nhân khác quan: trứng là đối tượng rất khó bảo quản lạnh do tỷ lệ nước rất cao, dễ hình thành tinh thể đá trong quá trình bảo quản lạnh, đặc biệt là đối với trứng bò đã IVM rất dễ bị tổn thương.

Kết quả thụ tinh trong ống nghiệm từ tế bào trứng đông lạnh

Tiến hành thụ tinh cho 1194 tế bào trứng sau khi giải đông (15 lần lặp lại), có 144 tế bào trứng được thụ tinh - giai đoạn phôi 2 tế bào, đạt tỷ lệ $11,67 \pm 4,08\%$. Kết quả của chúng tôi còn thấp hơn so với kết quả của nhóm tác giả Yang và đồng tác giả (2008) là 21,7%. Tỷ lệ phát triển đến các giai đoạn tiếp theo của phôi chưa cao so với các nghiên cứu ngoài nước, chỉ tạo được 46 phôi nang từ 1194 tế bào trứng đem thụ tinh. Ở Việt Nam, đây là công bố đầu tiên.



Hình 1. A. Tế bào trứng bò được chọn để IVM: tế bào chất đều, có ít nhất từ 2 đến 3 lớp cumulus bao quanh. B. Sự giãn nở cumulus ở tế bào trứng bò sau 24 h nuôi (X100). C. Tế bào trứng bò chín - có thể cực I (X400). D. Hình ảnh tế bào trứng sống (X100) sau giải đông theo đánh giá hình thái. E. Hình ảnh tế bào trứng chết (X100) sau giải đông theo đánh giá hình thái.



Hình 2. Các phôi bò thu được bằng kỹ thuật IVF từ tế bào trứng đông lạnh. A. Phôi 2 tế bào (X100); B. Phôi 4 - 8 tế bào (X100); C. Phôi dâu sớm (X400); D. Phôi nang sớm (X400).

Bảng 2. Kết quả đông lạnh tế bào trứng bằng phương pháp thủy tinh hóa.

Số đợt thí nghiệm	Số tế bào trứng đông lạnh	Tỷ lệ thu hồi tế bào trứng sau giải đông	Tỷ lệ tế bào trứng còn toàn vẹn về mặt hình thái/tế bào trứng thu hồi (%)
15	2155	82,43 ± 3,18 (1776 trứng)	76,08 ± 7,42 (1349 trứng)
$\alpha < 0,05$			

Bảng 3. Kết quả IVF từ tế bào trứng đông lạnh.

Số đợt thí nghiệm	Số tế bào trứng đem thụ tinh	Tỷ lệ (%)			
		Thụ tinh (phôi 2)	Phôi 4 - 8	Phôi dâu	Phôi nang
15	1194	11,67 ± 4,08 (144 phôi)	9,95 ± 3,90% (123 phôi)	5,37 ± 2,31% (67 phôi)	3,72 ± 1,86% (46 phôi)
$\alpha < 0,05$					

KẾT LUẬN

Đã bảo quản thành công tế bào trứng bò đã được IVM bằng đông lạnh thủy tinh hóa, với mức độ toàn vẹn của tế bào trứng sau giải đông đạt 76,08% (theo quan sát hình thái).

Lần đầu tiên đã tạo được phôi bò từ tế bào trứng đông lạnh thủy tinh hóa. Tỷ lệ thụ tinh đạt 11,67%, có 46/144 phôi phát triển đến giai đoạn phôi nang.

Lời cảm ơn: Xin chân thành cảm ơn các cán bộ công tác tại Công ty Kỹ nghệ súc sản Vissan đã tạo điều kiện cho chúng tôi thu nhận mẫu buồng trứng bò.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Alban MASSIP (2003) Cryopreservation of bovine oocytes: Current status and recent developments. *Reprod Nutr Dev* 43325-43330.
- Asada M, Fukui Y (2000) Effect on fertilization and development by re-culture after freezing and thawing of bovine oocytes matured *in vitro*. *Theriogenology* 54: 889-898.
- Chian Ri-Cheng, Kuwayama Masashige, Tan Leonard, Tan Justin, Kato Osamu and Nagai Takashi (2004) High survival rate of bovine oocytes matured *In Vitro* following vitrification. *J Reprod Develop* 50(6): 685-696.
- Edwards JL, Saxton AM, Lawrence JL, Payton RR, Dunlap JR (2005) Exposure to a physiologically relevant elevated temperature hastens *in vitro* maturation in Bovine Oocytes. *J Dairy Sci* 88: 4326-4333.
- Kanagawa, Shimohira, Saitoh (1995) Manual of Bovine embryo transfer. *Japan Livestock Technology Association. Chapter 8: 317-340.*
- Kim Dong-Hoon, Park Hyo-Suk, Kim Se-Woong, Hwang In-Sun, Yang Byoung-Chul, Im Gi-Sun, Chung Hak-Jae, Seong Hwan-Woo, Moon Seung-Joo and Yang Boh-Suk (2007) Vitrification of Immature Bovine Oocyte by The Microdrop Method. *J Reprod Develop* 53(4): 843-851.
- Lonergan Pat, Carolan Catherine, Langendonck Anne Van, Donnay Isabelle, Khatir Hadj, Mermillod Pascal (1996) Role of epidermal growth factor in Bovine Oocyte maturation and preimplantation embryo development *in vitro*. *Biol Reprod* 54: 1420-1429.
- Loos deF, Van Vliet C, Van Maurik P, Kruip ThAM (1989) Morphology of immature bovine oocytes. *Gamete Research* 24: 194-204.
- Martino A, Songsasen N, Leibo SP (1996) Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. *Biol Reprod* 54: 1059-1069.
- Men H, Monson RL, Rutledge JJ (2002) Effect of meiotic stages and maturation protocols on bovine oocyte's resistance to cryopreservation. *Theriogenology* 55: 1095-1103.
- Morató Roser, Izquierdo Dolores, Paramio Maria Teresa, Mogas Teresa (2008) Cryotops versus open-pulled straws (OPS) as carriers for the cryopreservation of bovine oocytes: Effects on spindle and chromosome configuration and embryo development. *Cryobiology* 57: 137-141.
- Nguyễn Thị Ước, Lê Văn Ty, Nguyễn Hữu Đức, Bùi Linh Chi, Nguyễn Trung Thành, Nguyễn Việt Linh, Nguyễn Văn Hạnh, Quán Xuân Hữu, Nguyễn Thuỳ Anh, Hoàng Nghĩa Sơn, Dương Đình Long, Bùi Xuân Nguyên (2003) Nghiên cứu sản xuất bò sữa giống thương phẩm bằng cây phôi thụ tinh ống nghiệm và xác định giới tính. *Hội nghị Công nghệ sinh học toàn Quốc*. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội: 717-719.
- Nguyễn Văn Lý (2006) Nghiên cứu các yếu tố ảnh hưởng đến kết quả thụ tinh trong ống nghiệm bò ở Việt Nam. Luận án Tiến sĩ Nông nghiệp, Viện Chăn nuôi.
- Otoi T, Yamamoto K, Koyama N, Tachikawa S, Suzuki T (1998) Cryopreservation of mature bovine oocytes by vitrification in straws. *Cryobiology* 37: 77-85.
- Tatjana Smiljakovi, Tomek W (2006) Meiotic maturation and *in vitro* maturation of Bovine Oocytes. *Biotechnology in Animal Husbandry* 22(1-2): 29-34.
- Vajta G, Holm P, Kuwayama M, Booth PJ, Jacobsen H, Greve T, Callesen H (1998) Open pulled straw (OPS) vitrification: A new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Mol Reprod Dev* 51: 53-58.
- Yang Byoung-Chul, Im Gi-Sun, Kim Dong-Hun, Yang Boh-Suk, Oh Hyun-Ju, Park Hyo-Suk, Seong Hwan-Hoo, Kim Sung-Woo, Ka Hak-Hyun, Lee Chang-Kyu (2008) Development of vitrified-thawed bovine oocytes after *in vitro* fertilization and somatic cell nuclear transfer. *Anim Reprod Sci* 103: 25-37.
- Yunus Cetin, Ayhan Bastan (2005) Cryopreservation of immature bovine oocytes by vitrification in straws. *Anim Reprod Sci* 92: 29.

BOVINE EMBRYO PRODUCTION BY *IN VITRO* FERTILIZATION USING CRYOPRESERVED GAMETES

Nguyen Thi Thuong Huyen^{2,1}, Pham Van Phuc¹, Hoang Nghia Son³, Phan Kim Ngoc^{1,*}

¹University of Science, Hochiminh City

²University of Pedagogy, Hochiminh City

³Institute of Tropical Biology

SUMMARY

This research aimed at bovine embryo production, using cryopreserved mature bovine oocytes by vitrification, and cryopreserved sperms. The cumulus-oocyte complexes (COCs) were obtained from cow ovaries by aspiration. COCs with three or more layers of cumulus cells and homogeneous cytoplasm were selected to be cultured in C₁ medium (TCM-199, 10% FBS, 10 ng EGF, 0.2 mM Na pyruvate, 50 µg/ml gentamicin) under the condition at 38.5°C with humidified atmosphere of 5% CO₂ in air. After 22 - 24 h incubation, matured oocytes were cryopreserved by vitrification method in straws in two steps: (i) oocytes were first equilibrated in the VS₁ solution (TCM-199 + 10% FBS + 10% DMSO + 10% EG) for 45 seconds; (ii) The oocytes were then transferred in the VS₂ solution (TCM-199 + 10% FBS + 20% DMSO + 20% EG + 1 M sucrose) for 25 seconds. Each straws were loaded with five to seven oocytes. Straws were plunged directly into liquid nitrogen within 25 - 40 seconds at the beginning of the exposure to second step. After storage in liquid nitrogen, thawing was performed by exposing the straw to air for 5 seconds, and plunged into warm water (37°C) for 10 seconds, and then transferred were oocytes into clean dish (Φ35); Oocytes were directly expelled into RD₁ medium (TCM-199 + 10% FBS + 0.25 M sucrose) 1.5 minutes, RD₂ medium (TCM-199 + 10% FBS + 0.15 M sucrose) 1.5 minutes and RD₃ (TCM-199 + 10% FBS) medium 5 minutes; This oocytes were transferred to C₁ medium and holding for 3 minutes. The thawing was performed in a room at 25°C. After 22 - 24 h incubation, the number of oocytes observed with Metaphase II stage were 2658/3276 (81.19 ± 2.75%); morphological intact recovered rate was 76.08%. After 22 - 24 h incubation with sperm, insemination rate (two-cell embryo) was 11.67% and 46/144 embryos developed into blastocyst stage.

Keywords: Bovine oocytes, cryopreservation, in vitro fertilization, vitrification

* Author for correspondence: Tel: 84-8-38397719; Fax: 84-8-38967365; E-mail: pkngoc@hcmuns.edu.vn