

SO SÁNH KẾT QUẢ TẠO PHÔI BÒ BẰNG KỸ THUẬT IVF TRỨNG TƯƠI VÀ TRỨNG ĐÔNG LẠNH VỚI TINH TRÙNG ĐÔNG LẠNH

Phan Kim Ngọc¹, Phạm Văn Phúc¹, Nguyễn Thị Thương Huyền², Dương Thị Thu¹, Nguyễn Thị Minh Nguyệt¹

¹Trường Đại học Khoa học tự nhiên, Đại học Quốc gia, Thành phố Hồ Chí Minh

²Trường Đại học sư phạm, Thành phố Hồ Chí Minh

TÓM TẮT

Tạo phôi bò trong ống nghiệm là một trong những phương pháp quan trọng để nhân nhanh đàn bò, đặc biệt là bò sữa. Nguồn trứng được sử dụng thường thuộc 1 trong 3 loại: trứng tươi thu từ bò cái hỗ trợ siêu âm, trứng tươi thu từ chọc hút buồng trứng lò mổ, hay nguồn trứng đã trưởng thành đông lạnh. Nguồn tinh trùng được sử dụng là tinh trùng đông lạnh. Nghiên cứu này nhằm mục đích so sánh hiệu quả thụ tinh và tạo phôi của tinh trùng đông lạnh với 3 nguồn trứng khác nhau: trứng tươi thu từ chọc hút hỗ trợ siêu âm trên bò cái (gọi tắt là trứng siêu âm), trứng tươi thu từ chọc hút buồng trứng thu từ lò mổ (gọi tắt là trứng lò mổ), trứng đông lạnh (nguồn trứng tươi chọc hút từ buồng trứng lò mổ được nuôi trưởng thành và đông lạnh). Các trứng tươi (từ lò mổ hay từ siêu âm) được nuôi trưởng thành trước khi thụ tinh; trứng đông lạnh được giải đông và ổn định trước khi thụ tinh. Tinh trùng được sử dụng để thụ tinh là tinh trùng đông lạnh dạng cọng rạ. Hiệu quả thụ tinh được đánh giá dựa vào sự hình thành phôi 2 tế bào. Hiệu quả phát triển phôi được ghi nhận vào các thời điểm phôi 2 tế bào, 8 tế bào, phôi dâu (morula) và phôi nang (blastocyst). Kết quả cho thấy, tỷ lệ thụ tinh cao nhất từ trứng siêu âm 67,83%, tiếp đến là trứng từ lò mổ 48,43% và thấp nhất là trứng đông lạnh 11,67%. Tỷ lệ phát triển phôi ở các giai đoạn cao nhất là ở trứng siêu âm với 47,93% trứng thụ tinh phát triển thành phôi 8 tế bào, 41,20% phôi dâu và 27,32% phôi nang; trong khi đó các tỷ lệ này giảm ở trứng lò mổ với 48,43% trứng thụ tinh, 34,13% phát triển thành phôi giai đoạn 8 tế bào, 23,06% phôi dâu và 18,01% phôi nang; và thấp nhất là trứng đông lạnh với 11,67% trứng thụ tinh, chỉ có 9,95% phát triển thành phôi 8, 5,37% phôi dâu và 3,72% phôi nang.

Từ khóa: Phôi bò, phôi dâu, phôi nang, trứng đông lạnh, trứng siêu âm, trứng lò mổ

MỞ ĐẦU

Thụ tinh trong ống nghiệm (*In vitro* fertilization - IVF) được tiến hành lần đầu tiên trên thỏ bởi Dautier và đồng tác giả vào năm 1954. Kỹ thuật này được Brackett và đồng tác giả ứng dụng vào chăn nuôi bò sữa từ năm 1982. Nguồn trứng sử dụng cho IVF có thể thu từ những động vật sống được kích hoạt bằng kích dục tố để gây rụng trứng hàng loạt; từ buồng trứng động vật giết mổ hay sử dụng trứng đông lạnh. Trong IVF, nếu sử dụng các trứng chưa trưởng thành cần có sự hỗ trợ của quá trình nuôi trứng trưởng thành (*In Vitro* Maturation - IVM). Ngoài ra, sử dụng trứng đông lạnh trong quá trình IVF cũng là một thử thách lớn vì tỷ lệ thụ tinh và phát triển phôi không cao do những tổn thương khó phục hồi ở màng nội chất và zona pellucida của trứng trong quá trình bảo quản. Theo kết quả nghiên cứu của Hochi (2003), tỷ lệ trứng thụ tinh sau rã đông là 36% và tỷ lệ phát triển lên blastocyst là 5%.

Do sự đa dạng trong nguồn mẫu, tay nghề của

người tiến hành, độ chính xác của trang thiết bị mà kết quả nghiên cứu của nhiều tác giả trong và ngoài nước có sự khác nhau khi sử dụng cùng một nguồn trứng hay các nguồn trứng khác nhau. Vì vậy, việc so sánh hiệu quả tạo phôi của các nguồn trứng khác nhau được tiến hành từ các nghiên cứu khác nhau cho thấy có nhiều sự khác biệt. Để đánh giá chính xác chất lượng của nguồn trứng, hiệu quả của việc tạo phôi của chúng; nghiên cứu này được tiến hành nhằm so sánh hiệu quả thụ tinh và phát triển phôi đến giai đoạn phôi nang của trứng tươi thu từ siêu âm, trứng tươi thu từ lò mổ và trứng đông lạnh thu từ lò mổ với cùng một loại tinh trùng đông lạnh, cùng một điều kiện thí nghiệm.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Chuẩn bị trứng

Chọc hút từ buồng trứng hỗ trợ siêu âm trên bò

Trứng được thu nhận từ bò cho trứng bằng

phương pháp siêu âm qua âm đạo. Bò cho trứng là bò sữa thể hệ F2 (Holstein Friesian) đã sinh 3 - 4 lần. Việc thu nhận được thực hiện 2 lần/tuần. Trứng được giữ trong môi trường, nhiệt độ được duy trì ở 36°C, nhanh chóng vận chuyển về phòng thí nghiệm. Tiến hành lọc lại dịch chứa trứng để giảm thể tích dịch, và rót dịch vào đĩa petri nhỏ, tìm trứng trên kính hiển vi soi nổi. Các trứng loại A và B được sử dụng để nuôi trưởng thành.

Chọc hút từ buồng trứng lò mổ

Buồng trứng bò thu tại lò mổ được bảo quản trong nước muối sinh lí ấm, chuyển nhanh về phòng thí nghiệm. Thu nhận trứng bằng phương pháp chọc hút: sử dụng đầu kim 18G gắn vào syringe 5 ml hút khoảng 1 ml dung dịch D-PBS có kháng sinh đã làm ấm trong becher; đâm mũi kim vào các nang có đường kính từ 2 - 8 mm, hút dịch nang cho đến khi được khoảng 3 ml sẽ chuyển dịch vào đĩa petri nhựa Ø60. Các đĩa này được chuyển vào tủ ấm 38,5°C từ 5 - 10 phút để lắng. Sau đó, soi tìm và phân loại trứng dưới kính hiển vi đảo ngược (hoặc kính hiển vi soi nổi) ở độ phóng đại 40 lần. Các trứng loại A và B được sử dụng để nuôi trưởng thành.

Trứng đông lạnh

Trứng thu nhận bằng cách chọc hút trực tiếp buồng trứng thu từ lò mổ được nuôi trưởng thành (IVM). Những trứng trưởng thành được chọn để đông lạnh theo phương pháp thủy tinh hóa (vitrification) 2 bước: Trứng được cân bằng trong môi trường VS₁ (TCM-199 + 10% FBS + 10% DMSO + 10% EG) 45 giây, sau đó chuyển qua môi trường VS₂ (TCM-199 + 10% FBS + 20% DMSO + 20% EG + 1 M sucrose) trong 25 giây. Sau đó chuyển trứng vào cọng rạ (straw) trong vòng 30 giây.

Trứng được rã đông theo quy trình sau: Lấy cọng rạ chứa trứng ra khỏi bình nitrogen lỏng, để trong không khí 5 giây, nhúng vào nước ấm 33 - 35°C, chuyển trứng vào đĩa nhựa Ø35. Sau đó, chuyển trứng từ đĩa Ø35 qua RĐ₁ (TCM-199 + 10% FBS + 0,25 M sucrose) trong 1,5 phút, RĐ₂ (TCM-199 + 10% FBS + 0,15 M sucrose) trong 1,5 phút, RĐ₃ (TCM-199 + 10% FBS) trong 5 phút ở nhiệt độ phòng. Sau cùng chuyển trứng vào đĩa chứa môi trường nuôi trứng, ổn định trứng ở điều kiện 38,5°C, 5% CO₂ từ 2 - 3 tiếng để giúp trứng hồi phục hoàn toàn trước khi đánh giá sự sống chết của trứng. Tất cả các trứng sống sau khi rã đông (đánh giá dựa vào sự bình thường về hình thái và tế bào chất) sẽ đem làm thụ tinh trong ống nghiệm.

Nuôi trưởng thành trứng

Trứng loại A và B (có từ 3 lớp cumulus trở lên) được chọn để nuôi trưởng thành. Cho 10 đến 20 phức hợp COCs (Cumulus Oocyte Complexes) vào giếng nuôi chứa môi trường C₁ (loại đĩa 4 giếng chứa 100 µl/giếng và phủ dầu khoáng). Nuôi trứng trong tủ ấm ở điều kiện 38,5°C, 5% CO₂, hơi nước bão hòa. Sau 22 - 24 h nuôi cấy, chuyển các trứng có cumulus giãn nở rộng sang các vi giọt sạch môi trường C₁ chờ để thụ tinh. Trong thí nghiệm đánh giá hiệu quả trưởng thành sau khi IVM, tất cả các trứng sau khi IVM bị tách bỏ lớp cumulus bằng mouth pipette và hyaluronidase. Trứng cho là trưởng thành sẽ có 1 thể cực, tế bào chất sáng, đều.

Chuẩn bị tinh trùng

Mỗi lần tiến hành sử dụng 2 cọng rạ 0,25 ml tinh trùng bò đông lạnh, giải đông bằng cách nhúng vào bể ổn nhiệt 37°C trong 15 giây. Tinh trùng đông lạnh được hoạt hóa trong môi trường BO bổ sung sodium caffeine benzoate 0,3885 mg/ml và heparin 4 mg/ml. Sau đó, tinh trùng được li tâm 2 lần tại 1800 vòng/phút trong 5 phút. Cuối cùng, mật độ tinh trùng được chỉnh về 6.10⁶ tế bào/ml bằng cách thêm môi trường BO (Brackette *et al.*, 1980; Brackette *et al.*, 1982; Manual of bovine embryo transfer, 1995).

Thụ tinh *in vitro*

Vi giọt tinh trùng: chuẩn bị 4 giọt tinh trùng trong đĩa Petri Ø35 với 95 µl dung dịch tinh trùng đã chuẩn bị trên một giọt (mật độ 6.10⁶ tế bào/ml), phủ dầu khoáng và giữ trong tủ ấm 38,5°C, 5% CO₂. Chuyển trứng vào vi giọt tinh trùng: chuyển 30 trứng trưởng thành trong 5 µl môi trường TCM-199 vào mỗi vi giọt đã chuẩn bị sẵn. Ủ ấm: ủ những đĩa này trong 5 h ở điều kiện 38,5°C và 5% CO₂.

Nuôi trứng đã thụ tinh

Sau 5 giờ thụ tinh, trứng được kiểm tra cho kết quả thụ tinh. Tách cụm trứng cumulus (COCs) ra khỏi vi giọt tinh trùng bằng pipette. Trứng được rửa 3 lần bằng môi trường CR1aa. Tách bỏ tế bào cumulus bằng cách hút nhả nhiều lần. Giữ đĩa này trong tủ ấm 38,5°C, 5% CO₂ (Manual of bovine embryo transfer, 1995). Các trứng đã thụ tinh thành công tiếp tục được nuôi thông qua các đánh giá xuất hiện tiền nhân và xuất hiện thể cực thứ hai. Sau 7 - 10 ngày nuôi, kiểm tra sự phát triển của phôi và phôi tốt được sử dụng để cấy chuyển (Lu *et al.*, 1987).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Trứng thu nhận từ phương pháp chọc hút buồng trứng lò mổ

Kết quả thụ tinh

Tỷ lệ thụ tinh của các trứng thu từ phương pháp chọc hút buồng trứng lò mổ là 48,43%. Kết quả thụ tinh từ nguồn trứng thu nhận tại lò mổ của nghiên cứu này thấp hơn so với kết quả của các nghiên cứu khác: 60,9% ở bò vàng và 54,7% ở bò Hà An sau khi thụ tinh 24 h (Nguyễn Thị Ước *et al.*, 1999), 72,96% ở bò lai Sind (Nguyễn Hữu Đức *et al.*, 2003), 67,7% (Otoi *et al.*, 1997), 56,11% (Avery *et al.*, 2003), 68,4% (Santos *et al.*, 2008). Đánh giá tỷ lệ thụ tinh thông qua sự xuất hiện thể cực thứ 2 và hai tiền nhân, sau đó đánh giá tỷ lệ tạo phôi thông qua sự hình thành phôi 2 tế bào. Tuy nhiên, dựa vào điều kiện thí nghiệm và kỹ thuật thao tác không quan sát được sự xuất hiện thể cực thứ 2, vì vậy chúng tôi chọn phương pháp đánh giá sự thụ tinh thông qua sự phân chia phôi 2 tế bào. Mặt khác, nguồn trứng thu nhận từ lò mổ không đồng đều về chất lượng, không xác định được nguồn giống nên khả năng sống và phát triển không đồng đều. Do đó, tỷ lệ thụ tinh của thí nghiệm này còn thấp.

Kết quả nuôi phôi

Kết quả bảng 2 cho thấy là 34,13% phôi (513 phôi) phát triển đến giai đoạn phôi 4 - 8 tế bào,

23,06% (338 phôi) phát triển đến giai đoạn phôi morula và 18,01% (272 phôi) phát triển đến giai đoạn phôi nang. Kết quả này thấp hơn so với các kết quả nghiên cứu trong và ngoài nước: tỷ lệ phôi phát triển đến giai đoạn phôi dâu 22,8% ở bò vàng, 26,9% ở bò Hà An (Nguyễn Thị Ước *et al.*, 1999); 72,96% hợp tử phân chia và có 25,88% phát triển đến giai đoạn phôi nang (Nguyễn Hữu Đức *et al.*, 2003); tỷ lệ phân chia của hợp tử là 42,07%, tỷ lệ phát triển đến giai đoạn phôi dâu, phôi nang là 19,86% (Pavlok *et al.*, 1992); (Otoi *et al.*, 1997) thu được kết quả phân chia khá cao là 69,57% nhưng chỉ có 15,01% phát triển lên giai đoạn phôi dâu, phôi nang; (Khurana, Niemann, 2000) thu được tỷ lệ phân chia của hợp tử và tỷ lệ phát triển đến giai đoạn phôi dâu, phôi nang lần lượt là 48,25% và 16,05%; (Pereira *et al.*, 2005) thu được kết quả là 86,0 - 92,1% hợp tử phân chia và 44,8 - 54,6% phôi nang; (Nguyễn Văn Lý, 2006) thu được tỷ lệ 51,29% hợp tử phân chia và 30,12% phôi dâu, phôi nang.

Kết quả của nghiên cứu này không cao bằng các công bố của các tác giả trong và ngoài nước, tuy nhiên khi xét sự chuyển tiếp của phôi lên các giai đoạn chính ở bảng 2 cho thấy: có 70,79% phôi 2 tế bào chuyển tiếp lên giai đoạn phôi 4 - 8 tế bào; 67,79% phôi 4 - 8 tế bào chuyển tiếp lên giai đoạn phôi dâu, tỷ lệ này khá cao vì phần lớn phôi bò bị "block" ở giai đoạn 8 tế bào và những phôi vượt qua giai đoạn này đều phát triển lên giai đoạn tiếp theo (78,00%).

Bảng 1. Kết quả thụ tinh của các loại trứng khác nhau.

Loại trứng	Số lần thí nghiệm	Số trứng đem thụ tinh	Số trứng đã thụ tinh	Tỷ lệ trứng đã thụ tinh
Lò mổ	20	1485/1643	704/1485	48,43 ± 6,74%
Siêu âm	3	983	676	67,83 ± 2,61%
Đông lạnh	15	1194	144	11,67 ± 4,08 %

Ghi chú: Số trứng đem thụ tinh/tổng số trứng thu nhận được; **Số trứng đã thụ tinh/tổng số trứng đem thụ tinh.

Trứng thu nhận từ phương pháp chọc hút hỗ trợ siêu âm

Kết quả thụ tinh

Tỷ lệ thụ tinh của trứng thu từ siêu âm là 67,83%. Tỷ lệ thụ tinh từ trứng thu nhận bằng phương pháp siêu âm là cao hơn so với các nghiên cứu khác: tỷ lệ thụ tinh 54,7 - 60,9% (Nguyễn Thị Ước *et al.*, 1999), 50,6% (Nguyễn Thị Ước *et al.*, 2003), 59% (De Roover *et al.*, 2005). Tuy nhiên, kết

quả này thấp hơn các kết quả nghiên cứu của (Gabiella Horvath *et al.*, 2006) là 88%, và (Gabiella Horvath *et al.*, 2008) là 83%.

Kết quả nuôi phôi

Trứng thu nhận bằng phương pháp siêu âm được nuôi trưởng thành và tiến hành thụ tinh *in vitro* có tỷ lệ phát triển thành phôi nang cao hơn so với trứng thu nhận từ lò mổ, và trứng đông lạnh. Tỷ lệ trứng đã

thụ tinh phát triển đến giai đoạn phôi nang là 27,32%.

Tỷ lệ trứng thụ tinh phát triển thành phôi nang trong nghiên cứu này tương đương với kết quả nghiên cứu của (Gabriella Horvath *et al.*,) là 22% (2006) và 29% (2008); 22,8% - 26,9% (Nguyễn Thị Ước *et al.*, 1999), 32,37% (Nguyễn Văn Lý *et al.*, 2003). Như vậy, tỷ lệ trứng thụ tinh phát triển thành

phôi nang từ trứng thu nhận bằng phương pháp siêu âm trong nghiên cứu này có thấp hơn tuy nhiên sự khác biệt này không có ý nghĩa về mặt thống kê. Tỷ lệ trứng thụ tinh phát triển thành phôi từ nguồn trứng siêu âm cao hơn từ nguồn trứng thu từ lò mổ. Kết quả này đã khẳng định được sự thành công bước đầu trong việc tạo phôi bò trong ống nghiệm từ nguồn trứng siêu âm.

Bảng 2. Kết quả phát triển thành phôi ở các giai đoạn khác nhau khi thụ tinh ở các loại trứng khác nhau.

Loại trứng	Số trứng đem thụ tinh	Tỷ lệ thụ tinh (phôi 2)	Tỷ lệ phôi 4 - 8	Tỷ lệ phôi dâu	Tỷ lệ phôi nang
Lò mổ	1485	48,83 ± 6,74% (704 phôi)	34,13 ± 6,73% (513 phôi)	23,06 ± 5,83% (338 phôi)	18,01 ± 4,91% (272 phôi)
Siêu âm	983	67,83 ± 2,61% (676 phôi)	47,93 ± 5,86% (488 phôi)	41,20 ± 2,89% (415 phôi)	27,32 ± 3,68% (270 phôi)
Đông lạnh	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)

Trứng giải đông từ trứng thu nhận bằng cách chọc hút buồng trứng lò mổ đông lạnh

Thụ tinh trong ống nghiệm từ trứng đông lạnh

Kết quả thụ tinh

Tiến hành thụ tinh cho 1194 trứng sống tốt sau khi giải đông qua 15 đợt thí nghiệm, chỉ có 144 trứng được thụ tinh và phát triển thành phôi 2 tế bào, đạt tỷ lệ 11,67 ± 4,08%. Kết quả này cao hơn kết quả của (Fuku *et al.*, 1992) là 4,9% trứng được thụ tinh phát triển thành phôi 2 tế bào. Tuy nhiên, kết quả của nghiên cứu này thấp hơn so với các nghiên cứu khác (Byoung-Chul Yang *et al.*, 2008) 20,6% phôi 2 tế bào; (Yang *et al.*, 2008) 21,7% phôi 2 tế bào. Riêng ở Việt Nam, cho đến nay vẫn chưa có kết quả nào công bố về tỷ lệ tạo phôi bò trong ống nghiệm từ nguồn trứng đông lạnh. Chính vì vậy, với kết quả đạt được đã phân nào khẳng định thành công bước đầu trong việc tạo phôi bò từ nguồn trứng đông lạnh.

Kết quả nuôi phôi

Từ kết quả bảng 2 cho thấy tỷ lệ phân chia các giai đoạn của phôi từ nguồn trứng đông lạnh thấp so với công trình đã công bố trên thế giới: (Yang *et al.*, 2008) 46,5%. Tuy nhiên, kết quả đạt được đã khẳng định sự thành công trong quy trình tạo phôi bò trong ống nghiệm từ nguồn trứng đông lạnh đến giai đoạn phôi nang. Trong thí nghiệm có 79,31% phôi 2 tế bào phát triển đến giai đoạn phôi 4 - 8 tế bào. Tỷ lệ

phôi phát triển đến giai đoạn phôi dâu thấp hơn, chỉ đạt 50,23%. Điều này phù hợp với lý thuyết phôi bò thường bị “block” ở giai đoạn chuyển tiếp này. Tỷ lệ phôi phát triển lên phôi nang là 63,30%.

So sánh hiệu quả tạo phôi từ thụ tinh *in vitro* của 3 nguồn trứng với tinh trùng đông lạnh

Các lô thí nghiệm được tiến hành trong cùng một điều kiện thí nghiệm, chất lượng môi trường tương tự và nguồn tinh trùng đông lạnh như nhau. Hình 2 cho thấy tỷ lệ phát triển của trứng đến phôi ở các giai đoạn giảm dần ở cả ba nguồn trứng. Quy trình tạo phôi sử dụng nguồn trứng thu nhờ siêu âm có hiệu quả tạo phôi cao hơn quy trình sử dụng nguồn trứng từ lò mổ và trứng đông lạnh ở tất cả các giai đoạn của phôi. Điều này cho thấy, trong cùng một điều kiện thí nghiệm, nguồn trứng từ siêu âm có chất lượng tốt và ổn định hơn nguồn trứng từ lò mổ và trứng đông lạnh.

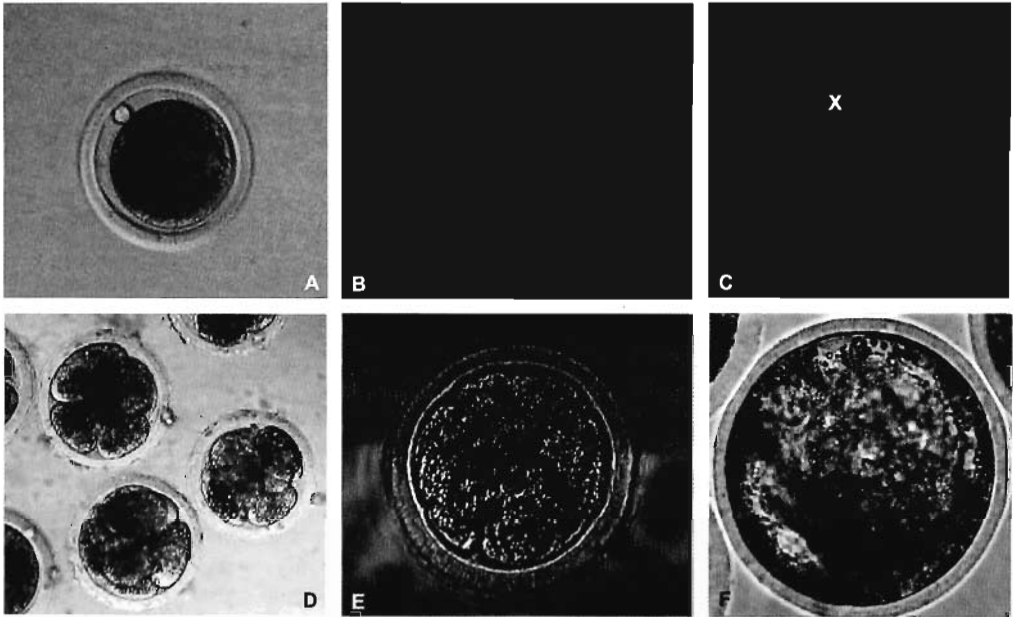
Hiệu quả tạo phôi từ nguồn trứng đông lạnh rất thấp, thấp hơn hiệu quả của quy trình với nguồn trứng tươi thu từ lò mổ. Điều này có thể giải thích được, vì trứng đông lạnh sử dụng trong nghiên cứu là trứng thu nhận từ lò mổ, sau đó được nuôi chín và đông lạnh. Sau quá trình đông lạnh, trứng đã bị ảnh hưởng cấu trúc màng sáng (zona pellucida), khả năng sống, khả năng thụ tinh và khả năng phát triển của phôi sau khi thụ tinh.

KẾT LUẬN

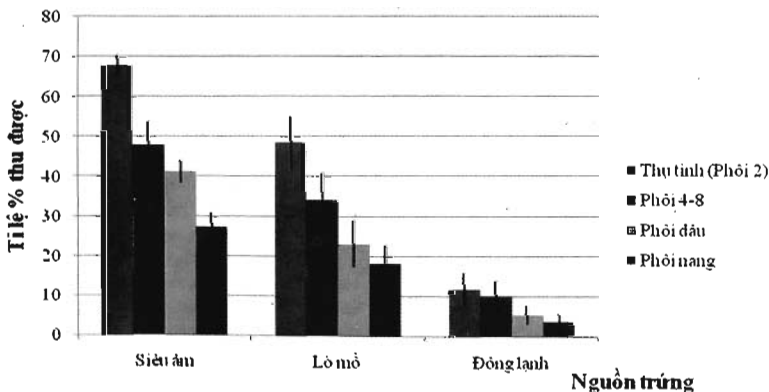
Tỷ lệ thụ tinh và tỷ lệ tạo phôi từ nguồn trứng tươi thu từ siêu âm cho hiệu quả cao nhất. Chất lượng trứng thu từ siêu âm ổn định, phù hợp cho việc nghiên cứu đặc tính di truyền vì hoàn toàn chủ động được nguồn trứng, số lượng và thời gian thích hợp cho công tác nghiên cứu. Trứng từ siêu âm đảm bảo được chất lượng nguồn gen của bố mẹ, chủ động trong chọn lọc nguồn gen hay cá thể bố mẹ. Có thể nói, nguồn trứng từ siêu âm phù hợp cho việc cải tiến và nhân nhanh đàn bò giống trong nước, đặc biệt là bò sữa.

Việc sử dụng nguồn trứng tươi thu từ buồng trứng thu nhận ở lò mổ thích hợp cho việc sử dụng làm nguyên liệu thực tập các thao tác kỹ thuật, chưa có ý nghĩa về mặt nghiên cứu di truyền và chọn lọc giống vì chất lượng không ổn định, không xác định được nguồn giống.

Kết quả tạo phôi từ nguồn trứng đông lạnh bước đầu chứng minh được tiềm năng ứng dụng của việc lưu trữ nguồn trứng có đặc tính di truyền tốt, mở ra khả năng ứng dụng việc đông lạnh trứng để phục vụ công tác nhân nhanh, bảo tồn giống và nguồn gen.



Hình 1. Một số hình ảnh kết quả của quy trình thụ tinh *in vitro* trứng bò với tinh trùng đông lạnh. A. Trứng MII; B. Phôi hai tế bào; C. Phôi 4 tế bào (X); D. Phôi 8 tế bào; E. Phôi dâu; F. Phôi nang.



Hình 2. So sánh hiệu quả tạo phôi ở các giai đoạn khác nhau từ 3 nguồn trứng khác nhau và tinh trùng nhập ngoại đông lạnh.

Lời cảm ơn: Công trình được thực hiện bằng kinh phí của Đề tài Khoa học Công nghệ cấp thành phố Hồ Chí Minh.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Avery B, Strobeck L, Jacobsen T, Bogh IB, Greve T (2003) *In vitro* maturation of bovine cumulus-oocyte complexes in undiluted follicular fluid: effect on nuclear maturation, pronucleus formation and embryo development. *Theriogenology* 59: 987-999.
- Brackett BG, Bousquet D, Boice ML, Donawick WJ, Evans JF, Dressel MA (1982) Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. *Biol Reprod* 27:147.
- Brackett BG, Yon K OH, Evans JF, Donawick JW (1980) Fertilization and early development of cow ova. *Biol Reprod* 23: 189-205.
- Byoung-Chul Yang, Gi-Sun Im, Dong-Hun Kim, Boh-Suk Yang, Hyun-Ju Oh, Hyo-Suk Park, Hwan-Hoo Seong, Sung-Woo Kim, Hak-Hyun Ka, Chang-Kyu Lee (2008) Development of vitrified-thawed bovine oocytes after *in vitro* fertilization and somatic cell nuclear transfer. *Anim Reprod Sci* 103(1-2): 25-37.
- Dauzier L, Thibault C, Wintenberger S (1954) La fecondation *in vitro* de l'oeuf de lapine. *Comptes Rendus Acad Sci (Paris)* 238: 844-845.
- De Roover R, Genicot G, Leonard S, Bols P, Dessy F (2005) Ovum pick up and *in vitro* embryo production in cows superstimulated with an individually adapted superstimulation protocol. *Anim Reprod Sci* 86: 13-25.
- Fuku E, Kojima T, Shioya Y, Marcus GJ, Downey BR (1992) *In vitro* fertilization and development of frozen - thawed bovine oocytes. *Cryobiology* 29: 485-492.
- Hochi S (2003) Cryopreservation of follicular oocytes and preimplantation embryos in cattle and horses. *J Reprod Develop* 49(1):13-21.
- Horvath G, Seidel GE (2006) Vitrification of bovine oocytes after treatment with cholesterol-loaded methyl- β -cyclodextrin. *Theriogenology* 66: 1026-1033.
- Horvath G, Seidel GE (2008) Use of fetuin before and during vitrification of bovine oocytes. *Reprod Domest Anim* 43(3): 333-338.
- Hiroshi Kanayawa, Itsuo Shimohira, Norio Saitoh (1995) (1995) *Manual of bovine embryo transfer*. Japan Livestock Technology Association: 149-151.
- Khurana NK, 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* 54:741-756.
- Lu KH, Gordon I, Gallagher M, McGovern H (1987) Pregnancy established in cattle by transfer of embryos derived from *in vitro* fertilization of oocytes matured *in vitro*. *Vet Rec* 121: 259-260.
- 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 lai Sind. *Hội nghị Công nghệ sinh học toàn quốc*. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội: 699-702.
- 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 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. *Hội nghị công nghệ sinh học toàn quốc*. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội: 717-719.
- 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. *Hội nghị công nghệ sinh học toàn quốc*. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội: 934-936.
- 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*: 109.
- Nguyễn Văn Lý, Nguyễn Thị Hoa (2003) Nuôi cấy phôi bò trong ống nghiệm. *Tạp chí Nông nghiệp và Phát triển Nông thôn* 7: 854-858.
- 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: 36-41.
- Pavlok A, Lucas-Hahn A, Niemann H (1992) Fertilization and development competence of bovine oocytes derived from different categories of antral follicles. *Mol Reprod Dev* 31: 63-67.
- Pereira DC, Dode MA, Rumpf R (2005) Evaluation of different culture systems on the *in vitro* production of bovine embryos. *Theriogenology* 63(4): 1131-1141.
- Santos P, Chaveiro A, Simões N, Moreira da Silva F (2008) Bovine Oocyte Quality in Relation to Ultrastructural Characteristics of Zona Pellucida, Polyspermic Penetration and Developmental Competence. *Reprod Domest Anim* 43(6): 685-689.
- Yang BC, Im GS, Kim DH, Yang BS, Oh HJ, Park HS, Seong HH, Kim SW, Ka HH, Lee CK (2008) Development of vitrified-thawed bovine oocytes after *in vitro* fertilization and somatic cell nuclear transfer. *Anim Reprod Sci* 103(1-2): 25-37.

EFFECT OF BOVINE EMBRYO PRODUCTION BY *IN VITRO* FERTILIZATION OF FRESH AND CRYOPRESERVED OOCYTES WITH CRYOPRESERVED SPERMS

Phan Kim Ngoc^{1,*}, Pham Van Phuc¹, Nguyen Thi Thuong Huyen², Duong Thi Thu¹, Nguyen Thi Minh Nguyet¹

¹University of Science, Vietnam National University, Ho Chi Minh City

²University of Pedagogy, Ho Chi Minh City

SUMMARY

Bovine embryo production is an important measure to proliferate cows, especially for milk cows. The oocytes used in embryo production usually were those fresh derived from cows ultrasound guided follicle aspiration, fresh oocytes derived from ovary aspiration or cryopreserved. This research aimed to compare efficiency of bovine embryo production by in vitro fertilization of fresh oocytes derived from ultrasound guided follicle aspiration (abbreviation: ultrasounded oocytes), fresh oocytes derived from ovary aspiration (abbreviation: slaughter-house oocytes), and cryopreserved oocytes (good grade oocytes derived from ovary aspiration were cryopreserved, and thawed before use). Cryopreserved sperms were used to inseminate oocytes. Efficiency of fertilization was based on ratio of 2-cell embryo formed. Efficiency of embryo development was based on ratio of 8-cell embryos, morula embryos, and blastocysts. The results showed that highest efficiency of fertilization was of ultrasounded oocytes with cryopreserved sperms, and lowest of cryopreserved oocytes. In the experiment with ultrasounded oocytes, there were 47.93% of fertilized oocytes forming 2-cell embryos, 41.20% of morula embryos, and 27.32% of blastocyst embryos; while there were 34.13, 23.06, and 18.01% in the experiment with slaughter-house oocytes, 11.67, 9.95, and 5.37% in the experiment with cryopreserved oocytes, respectively.

Keywords: Blastocyst, bovine embryo, cryopreserved oocyte, morula, slaughter-house oocyte, ultrasounded oocyte

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