

ẢNH HƯỞNG CỦA 6-DIMETHYLAMINOPURINE, CYTOCHALASIN B VÀ CYCLOHEXIMIDE ĐẾN KHẢ NĂNG PHÁT TRIỂN *IN VITRO* CỦA PHÔI LỢN Ỉ NHÂN BẢN KHÔNG MÀNG SÁNG

Nguyễn Khánh Vân, Quán Xuân Hữu, Vũ Thị Thu Hương, Phạm Doãn Lân✉

Phòng Thí nghiệm trọng điểm Công nghệ tế bào động vật, Viện Chăn nuôi

✉Người chịu trách nhiệm liên lạc. E-mail: pdlanvn@yahoo.com

Ngày nhận bài: 20.8.2019

Ngày nhận đăng: 25.11.2019

TÓM TẮT

Nghiên cứu này được thực hiện để đánh giá ảnh hưởng của 6-dimethylaminopurine (6-DMAP), cytochalasin B (CyB) và cycloheximide (CHX) đến khả năng phát triển *in vitro* của phôi lợn Ỉ nhân bản. Các tế bào trứng sau cấy chuyển nhân tế bào soma (nguyên bào sợi lợn Ỉ) được hoạt hóa với 2mM 6-DMAP; 7,5µg/ml CyB và 10µg/ml CHX. Kết quả cho thấy tỷ lệ tế bào trứng không bị phân rã sau khi hoạt hóa với CHX (84,72%) thấp hơn có ý nghĩa so với nhóm 6-DMAP và nhóm CyB (tương ứng: 90,91% và 88,01%, $P < 0,05$). Tỷ lệ hình thành phôi nang giữa hai nhóm 6-DMAP và CyB không khác nhau (tương ứng: 24,93% so với 24,41%, $P < 0,05$) và cao hơn so với nhóm CHX (15,01%, $P < 0,05$). Trung bình tổng số tế bào/phôi nang của hai nhóm 6-DMAP và CyB là cao hơn so với nhóm CHX (tương ứng: 47,78 và 44,57 so với 39,42). Việc sử dụng 6-DMAP, Cytochalasin B trong quá trình hoạt hóa tế bào trứng lợn sau cấy chuyển nhân tế bào soma cho hiệu quả tạo phôi nang lợn Ỉ nhân bản cao hơn so với Cycloheximide. Kết quả của nghiên cứu này cho thấy, lần đầu tiên tại Việt Nam đã tạo được phôi lợn Ỉ nhân bản không có màng sáng với tỷ lệ tạo phôi nang lợn Ỉ nhân bản dao động từ 15,01% – 24,93%.

Từ khóa: cycloheximide, cytochalasin B, 6-dimethylaminopurine, hoạt hóa, phôi lợn Ỉ cấy chuyển nhân tế bào soma, tế bào trứng lợn,

ĐẶT VẤN ĐỀ

Sự phát triển của kỹ thuật cấy chuyển nhân tế bào soma (SCNT) với mục đích tạo ra động vật nhân bản đã mở ra hướng nghiên cứu mới trong công nghệ sinh sản và y sinh. Đã có nhiều nghiên cứu được thực hiện trên lợn nhằm khai thác tiềm năng ứng dụng của SCNT, kết quả đã tạo được lợn con nhân bản bằng SCNT (Polejaeva *et al.*, 2000). Tuy nhiên, khả năng phát triển của phôi lợn SCNT vẫn thấp. Hiệu quả tạo phôi SCNT chịu ảnh hưởng của nhiều yếu tố như: chất lượng tế bào trứng nhận (Wakayama, Yanagimachi, 2001), giai đoạn phát triển của tế bào cho (De Sousa *et al.*, 2002), thời gian nhân tế bào cho ở trong tế bào trứng nhận (Akagi *et al.*,

2003), phương pháp hoạt hóa tế bào trứng (Yang *et al.*, 2005), sự biểu hiện và trạng thái di truyền của hệ gen tế bào cho (Inoue *et al.*, 2007). Đặc biệt, quá trình hoạt hóa tế bào trứng là một trong các yếu tố quan trọng có ảnh hưởng tới sự phát triển của phôi SCNT.

Hoạt hóa tế bào trứng bằng dòng điện là phương pháp phổ biến để hoạt hóa tế bào trứng sau cấy chuyển nhân tế bào soma (Boquest *et al.*, 2002). Tuy nhiên, khi sử dụng dòng điện cho quá trình hoạt hóa chỉ gây ra sự gia tăng nồng độ Ca^{2+} tức thời, không tạo được sự gia tăng nồng độ Ca^{2+} liên tục như quá trình thụ tinh thông thường. Điều này sẽ ảnh hưởng đến khả năng phát triển của phôi SCNT (Park *et al.*, 2010). Chính vì thế,

các nhà nghiên cứu đã cố gắng tìm kiếm một phương pháp tối ưu với các chất hoạt hóa khác nhau.

Một số chất hóa học như 6-dimethylaminopurine (6-DMAP), cytochalasin B (CyB), cycloheximide (CHX) đã được nghiên cứu sử dụng cho quá trình hoạt hóa tế bào trứng lợn. CHX là một chất ức chế quá trình tổng hợp protein được sử dụng để hoạt hóa tế bào trứng thành thực bằng cách ngăn chặn quá trình hoạt động của MPF (M-phase promoting factor) và quá trình sản xuất cyclin B (Cheng *et al.*, 2007). 6-DMAP là một chất ức chế protein kinase, có thể kích hoạt lại quá trình giảm phân ở các loài khác nhau bằng cách ngăn chặn sự phosphoryl hóa protein và ức chế sự hoạt hóa của MPF và sự xuất hiện của thể cực thứ hai. Cytochalasin B có tác dụng ngăn chặn sự trùng hợp filament actin và được sử dụng rộng rãi nhằm ngăn chặn sự xuất hiện của thể cực trong phôi SCNT.

Việc xử lý tế bào trứng lợn sau cấy chuyển nhân tế bào soma với 6-DMAP, CyB, CHX kết hợp với dòng điện đã cải thiện được khả năng phát triển tiếp theo của phôi SCNT (Lee *et al.*, 2004). Tuy nhiên, cho đến nay vẫn chưa có một phương pháp hoạt hóa chung sử dụng tạo phôi SCNT cho tất cả các giống loài. Do đó việc đánh giá ảnh hưởng của 6-DMAP, CyB, CHX đến hiệu quả tạo phôi lợn Ỉ nhân bản là cần thiết.

Tại Việt Nam, số lượng lợn Ỉ đang ngày càng thu hẹp gần đến mức tuyệt chủng, hiện nay số lượng chỉ còn rất ít. Chính vì thế, việc lưu giữ, bảo tồn và lai tạo giống lợn Ỉ là cần thiết. Tạo phôi và động vật nhân bản là một lĩnh vực nghiên cứu còn mới ở Việt Nam, đặc biệt là chưa có tác giả nào báo cáo về việc nghiên cứu và tạo phôi lợn Ỉ nhân bản bằng kỹ thuật cấy chuyển nhân tế bào soma. Việc tạo thành công phôi lợn Ỉ nhân bản có ý nghĩa rất lớn trong việc bảo tồn và lưu giữ nguồn gen động vật cũng như sự đa dạng sinh học. Mục đích của nghiên cứu này là đánh giá ảnh hưởng của việc sử dụng 6-DMAP; CHX và CyB trong quá trình hoạt hóa tế bào trứng lợn sau cấy chuyển nhân tế bào soma đến hiệu quả tạo phôi lợn Ỉ nhân bản.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Vật liệu

Các hóa chất sử dụng trong nghiên cứu này được cung cấp bởi hãng Sigma – Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Chuẩn bị nguyên bào sợi lợn Ỉ

Nguyên bào sợi lợn Ỉ được thu từ mô tai lợn Ỉ thuần được nuôi tại Trung tâm lợn giống Dabaco – Bắc Ninh. Các mẫu mô tai lợn Ỉ được loại bỏ hết lông, mỡ thừa và cắt thành các mảnh nhỏ có diện tích khoảng 1mm² và nuôi trong môi trường nuôi nguyên bào sợi DMEM có bổ sung 10% huyết thanh thai bê, 100 IU penicilin/ml và 0,1mg streptomycin/ml ở điều kiện 37°C; 5% CO₂, độ ẩm không khí bão hòa. Trong quá trình nuôi, nếu quan sát thấy đĩa nuôi có màu vàng thì phải thay môi trường nuôi mới. Sau 9-10 ngày, quan sát thấy có nguyên bào sợi phát triển xung quanh mảnh mô thì loại bỏ hết các mảnh mô, thay môi trường nuôi mới và nuôi tiếp cho tới khi các nguyên bào sợi phát triển tới > 80% đáy đĩa nuôi thì cấy chuyển. Sử dụng các nguyên bào sợi ở lần cấy chuyển 5-10 cho quá trình cấy chuyển nhân tế bào soma. Nuôi nguyên bào sợi trong môi trường nuôi có bổ sung 0,5% huyết thanh thai bê trong 48 giờ để các nguyên bào sợi đạt tới trạng thái cấy chuyển được đồng pha chu trình tế bào về giai đoạn G0/G1 trước khi sử dụng cho quá trình cấy chuyển nhân.

Nuôi tế bào trứng lợn thành thực in vitro

Buồng trứng lợn sử dụng cho thí nghiệm được thu từ lò mổ, bảo quản trong dung dịch PBS có bổ sung 100 IU penicilin/ml và 0,1mg streptomycin/ml, được vận chuyển về phòng thí nghiệm ở 30-35°C trong vòng 2-3 giờ. Sử dụng phương pháp chọc hút để thu tế bào trứng lợn từ những nang trứng có đường kính 3-6mm trên buồng trứng. Tế bào trứng sau khi thu và lựa chọn dưới kính hiển vi soi nổi được nuôi trong đĩa 4 giếng chứa môi trường nuôi POM1 có bổ sung EGF (10 ng/ml), eCG (1000 IU/ml), hCG (1000 IU/ml) và 1 mM dbcAMP (50 tế bào trứng/giếng) trong vòng 20 -22 giờ ở điều kiện 38,5°C, 5% CO₂, độ ẩm không khí bão hòa. Sau

20 -22 giờ, tế bào trứng được chuyển sang nuôi trong môi trường nuôi POM2 có bổ sung EGF (10 ng/ml), eCG (1000 IU/ml) và hCG (1000 IU/ml) trong vòng 20 -22 giờ ở điều kiện 38,5°C; 5% CO₂, độ ẩm không khí bão hòa.

Loại nhân tế bào trứng lợn

Sau 40-44 giờ nuôi thành thực *in vitro*, các tế bào trứng được chuyển sang môi trường TALP-HEPES có bổ sung 0,1% hyaluronidase và loại bỏ toàn bộ lớp tế bào cận noãn. Lựa chọn các tế bào trứng lợn thành thực cho quá trình loại nhân dựa vào sự xuất hiện của thể cực thứ nhất. Quá trình loại nhân được thực hiện theo phương pháp của Hosseini và đồng tác giả (2013) có cải biến.

Tế bào trứng lợn thành thực *in vitro* trước khi loại nhân sẽ được loại bỏ màng sáng và xử lý với demecolcine. Quá trình loại bỏ màng sáng được thực hiện như sau: tế bào trứng lợn thành thực *in vitro* được chuyển sang môi trường loại bỏ màng sáng có chứa 1,5µg/ml pronase trong vòng 3 – 6 phút. Sau loại bỏ màng sáng, tế bào trứng được chuyển sang môi trường TALP-HEPES + 10% huyết thanh bê mang thai. Tế bào trứng lợn đã được loại bỏ màng sáng sẽ được chuyển sang môi trường PZM3 có bổ sung 4 µM demecolcine trong vòng 20- 40 phút. Mục đích của việc xử lý tế bào trứng với demecolcine nhằm đẩy phần nhân ra sát phần ngoại vi màng tế bào trứng tạo thành một khối hình nón lồi ra khi quan sát dưới kính hiển vi soi nổi, qua đó dễ dàng xác định vị trí của nhân tế bào trứng trong quá trình loại nhân.

Sau khi xử lý với demecolcine, tế bào trứng được loại nhân trong môi trường TALP-HEPES có chứa 0,5µg/ml cytochalasin B dưới kính hiển vi. Tế bào trứng sẽ được loại bỏ một phần nhỏ tế bào chất (5-10% thể tích tế bào trứng) có chứa hình nón lồi ra trên màng tế bào trứng bằng micro pipette dưới kính hiển vi soi nổi có độ phóng đại 100 lần (Hình 1).

Cấy chuyển nhân tế bào soma (SCNT) và dung hợp

Tế bào trứng sau loại nhân được chuyển vào dung dịch chứa 1mg/ml phytohemagglutinin (PHA) từ 2 – 3 giây. Tiếp theo, cứ một tế bào trứng nhận sẽ được dính với 1 tế bào cho (nguyên

bào sợi lợn I) để tạo cặp tế bào cho – tế bào trứng nhận. Tế bào trứng nhận sau khi đã dính với tế bào cho được chuyển sang dung dịch dung hợp, để 2-3 phút cho đến khi tế bào chìm hẳn xuống đáy đĩa thì chuyển sang buồng dung hợp có chứa môi trường dung hợp và kết nối với máy dung hợp. Cặp tế bào cho – tế bào trứng nhận được dung hợp ở 1,2 kV/cm trong thời gian 30µs.

Sau dung hợp các cặp tế bào cho – tế bào trứng nhận được chuyển vào môi trường PZM3 để trong tủ nuôi ở điều kiện 38,5°C, 5% CO₂, 5% O₂ và độ ẩm không khí bão hòa. Sau 2 giờ kiểm tra và loại bỏ các cặp đôi không dung hợp được, chỉ sử dụng các cặp tế bào cho – tế bào trứng nhận đã dung hợp được để hoạt hóa tái cấu trúc.

Đánh giá ảnh hưởng của 6-DMAP, CyB, CHX đến hiệu quả tạo phôi lợn I nhân bản

Tại thời điểm 2 giờ sau dung hợp, các cặp tế bào cho – tế bào trứng nhận đã dung hợp sẽ được xung điện lại ở 1 kV/cm trong thời gian 80 µs. Tiếp theo, các cặp tế bào cho – tế bào trứng nhận được chuyển sang ba môi trường hoạt hóa khác nhau: (1) môi trường ZPM3 có bổ sung 2 mM 6-DMAP trong vòng 3 giờ; (2) môi trường PZM3 có bổ sung 10 µg/ml CHX trong vòng 6 giờ; (3) môi trường PZM3 có bổ sung 7,5 µg/ml CyB trong vòng 3 giờ ở điều kiện 38,5°C, 5% CO₂, 5% O₂ và độ ẩm không khí bão hòa. Sau hoạt hóa, các cặp tế bào cho – tế bào trứng nhận (hợp tử giả định) sẽ được chuyển sang nuôi trong hệ thống microwell có chứa môi trường PZM3 ở điều kiện 38,5°C, 5% CO₂, 5% O₂ và độ ẩm không khí bão hòa. Tại thời điểm nuôi ở ngày thứ 5 sau hoạt hóa (ngày hoạt hóa coi là ngày 0) bổ sung 10% huyết thanh thai bê vào môi trường nuôi PZM3. Kiểm tra khả năng phân chia, tạo phôi nang ở ngày thứ 2 và thứ 7 sau hoạt hóa.

Kiểm tra tổng số tế bào của phôi nang lợn I nhân bản

Tất cả các phôi nang lợn I nhân bản được tạo ra bằng kỹ thuật SCNT được xác định tổng số tế bào sau khi nhuộm với Hoechst 33342 (Hình 3). Quá trình nhuộm phôi bao gồm các bước:

- Chuẩn bị ba loại môi trường (1) Hoechst 33342 stock: 250 µg Hoechst 33342/ml Ethanol tuyệt

đôi; (2) dung dịch nhuộm phôi: 50 µl Hoechst 33342 stock + 450 µl ethanol tuyệt đối; (3) dung dịch rửa phôi: PBS + 0,3% PVP.

- Rửa phôi trong dung dịch PBS có bổ sung 0,3% PVP; tiếp theo chuyển phôi vào dung dịch nhuộm phôi để qua đêm ở 4°C. Chuẩn bị đĩa 4 giếng: giếng 1 chứa 500 µl ethanol tuyệt đối; giếng 2 chứa 1 ml glycerol. Hút phôi sau khi đã cố định trong dung dịch nhuộm phôi vào giếng 1 để rửa phôi sau đó chuyển phôi sang giếng 2 và rửa phôi trong dung dịch glycerol. Sau khi phôi được rửa trong glycerol; chuyển phôi sang lam kính, mỗi phôi một giọt và xếp hàng dọc theo chiều dọc lam kính. Đậy lamên lên lam kính, soi kiểm tra dưới kính hiển vi huỳnh quang.

Phân tích và xử lý số liệu

Số liệu được xử lý thống kê bằng phần mềm Microsoft Excell 2010, sự sai khác có ý nghĩa được kiểm tra bằng hàm ANOVA, sự sai khác có ý nghĩa với $P < 0,05$.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Ảnh hưởng của 6-DMAP, CyB, CHX đến chất lượng tế bào trứng sau hoạt hóa

Ảnh hưởng của 6-DMAP, CyB và CHX đến chất lượng tế bào trứng lợn sau hoạt hóa lên tỷ lệ tế bào trứng bị phân rã ở ngày thứ 2 sau hoạt hóa được thể hiện ở Bảng 1. Kết quả cho thấy, tỷ lệ tế bào trứng không bị phân rã thấp nhất là ở nhóm CHX (84,72%, $P < 0,05$) và cao nhất ở nhóm 6-DMAP (90,91%). Tuy nhiên tỷ lệ này là không khác nhau giữa nhóm 6-DMAP và CyB ($P > 0,05$). Trong nghiên cứu này, tỷ lệ tế bào trứng bị phân rã sau xử lý với CHX là cao hơn so với nhóm 6-DMAP và CyB (Bảng 1). Theo Roy và đồng tác giả (2017), việc sử dụng riêng lẻ CHX cho quá trình hoạt hóa tế bào trứng lợn sau cấy chuyển nhân tế bào soma có thể gây nên các kích thích quá mức hơn so với 6-DMAP và CyB. Đó cũng có thể là nguyên nhân khiến các tế bào trứng dễ bị phân rã hơn sau khi hoạt hóa bằng CHX.

Bảng 1. Ảnh hưởng của 6-DMAP, CyB, CHX đến chất lượng tế bào trứng sau hoạt hóa

Chất hoạt hóa	Số tế bào trứng được hoạt hóa	Số tế bào trứng bị phân rã sau hoạt hóa (n)	Tế bào trứng không bị phân rã sau hoạt hóa (n, % (Mean ± SE))
6-DMAP	392	38	356 90,91 ± 1,38 ^a
CyB	328	33	288 88,01 ± 1,54 ^a
CHX	324	58	266 84,72 ± 1,62 ^b

Ghi chú: Các giá trị trong cùng một cột có chữ cái khác nhau là sai khác có ý nghĩa ($P < 0,05$)

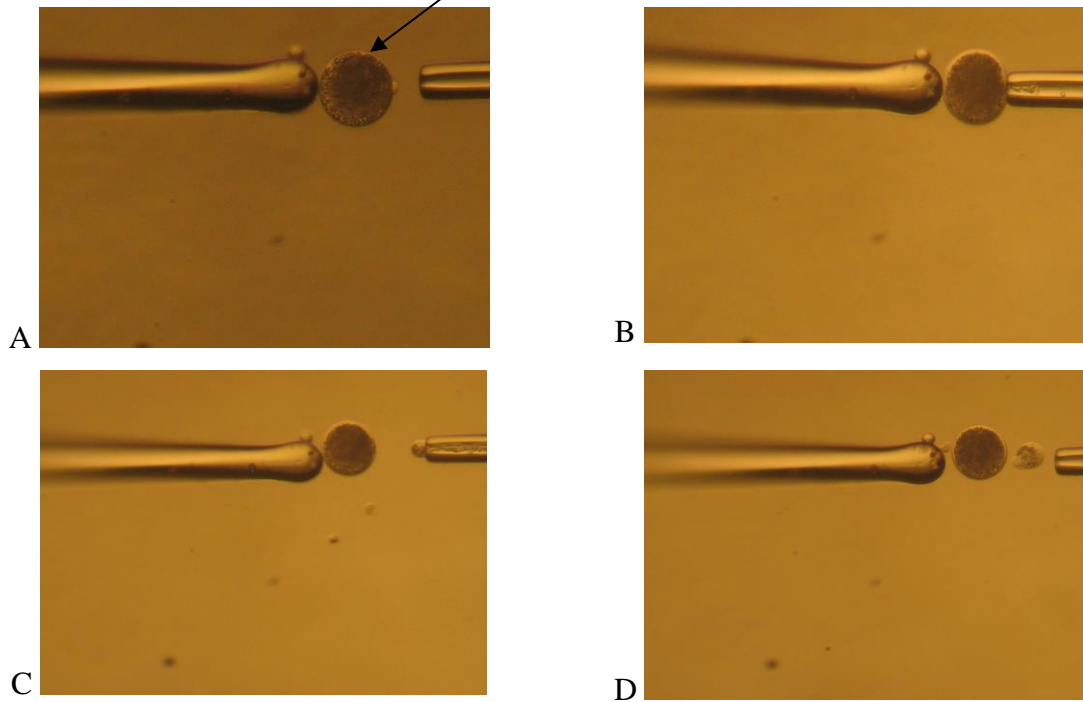
Ảnh hưởng của 6-DMAP, CyB, CHX đến hiệu quả tạo phôi lợn Ỉ nhân bản

Trong nghiên cứu này, ảnh hưởng của việc sử dụng 6-DMAP, CyB và CHX trong quá trình hoạt hóa tế bào trứng lợn sau cấy chuyển nhân tế bào soma đến hiệu quả tạo phôi lợn Ỉ nhân bản được đánh giá dựa trên tỷ lệ tế bào trứng phân chia, tạo phôi nang. Kết quả thể hiện ở Bảng 2.

Kết quả ở Bảng 2 cho thấy, tỷ lệ phân chia

và hình thành phôi nang (Hình 2) của nhóm CHX (tương ứng 75,01% và 15,01%) là thấp hơn có ý nghĩa ($P < 0,05$) so với nhóm 6-DMAP (tương ứng 83,81% và 24,93%) và CyB (tương ứng 84,98% và 24,41%). Sự khác nhau về tỷ lệ phân chia, tạo phôi nang giữa hai nhóm 6-DMAP và CyB là không có ý nghĩa ($P > 0,05$). Bên cạnh đó, trung bình tổng số tế bào/phôi nang của nhóm CHX (39,42) cũng thấp hơn so với nhóm 6-DMAP (47,78) và CyB (44,57).

Phần tế bào chất lõi ra sau xử lý với demelcocine có chứa nhân



Hình 1. Quá trình loại nhân tế bào trứng lợn (độ phóng đại 100 lần). Ghi chú: (A) Tế bào trứng lợn với phần nhân lõi ra sau xử lý với Demecolcine. (B) Hút bỏ phần tế bào chất lõi ra có chứa nhân. (C) Tế bào chất có chứa nhân đã được hút bỏ. (D) Tế bào trứng sau loại nhân.

Bảng 2. Ảnh hưởng của 6-DMAP, CyB, CHX đến hiệu quả tạo phôi lợn Ỉ nhân bản.

Chất hoạt hóa	Số lượng tế bào trứng được nuôi sau hoạt hóa (n)	Phân chia n, % (Mean ± SE)	Phôi nang n, % (Mean ± SE)	Tổng số tế bào/phôi nang (Mean ± SE)
6-DMAP	356	298	88	47,78 ± 2,36
		83,81 ± 1,98 ^a	24,93 ± 2,01 ^a	
CyB	288	244	70	44,57 ± 1,88
		84,98 ± 1,22 ^a	24,41 ± 1,82 ^a	
CHX	266	199	39	39,42 ± 2,06
		75,01 ± 2,03 ^b	15,01 ± 1,34 ^b	

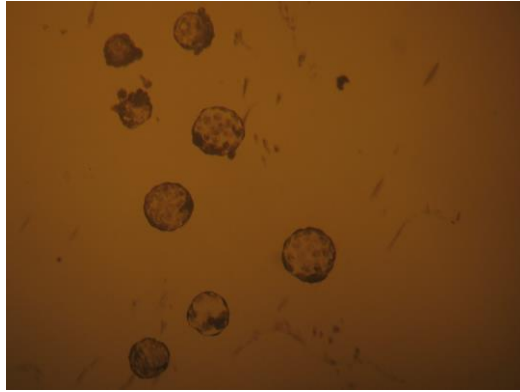
Ghi chú: Các giá trị trong cùng một cột có chữ cái khác nhau là sai khác có ý nghĩa (P < 0,05)

Theo Nanassy và đồng tác giả (2008), tế bào trứng lợn sau SCNT thường được xử lý với 10 µg/ml CHX trong vòng 5-6 giờ sau khi đã được hoạt hóa bằng một xung điện. Chính vì

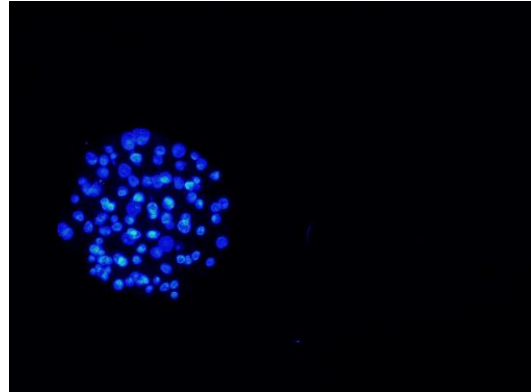
thế, trong nghiên cứu này tế bào trứng lợn sau SCNT được xử lý với CHX trong vòng 6 giờ. CHX là một chất ức chế quá trình tổng hợp protein. Theo Mario và đồng tác giả (2003), để

ngăn chặn sự hoạt động của CSF (c-mos/mitogen-activated protein kinase) hoặc MPF (M-phase promoting factor) trong quá trình hoạt hóa tế bào trứng sau cấy chuyển

nhân, sự có mặt của chất ức chế quá trình tổng hợp protein là cần thiết để khởi đầu cho quá trình phân chia và phát triển tiếp theo của tế bào trứng sau hoạt hóa.



Hình 2. Phôi nang lợn Ỉ nhân bản không có màng zona pellucida (độ phóng đại 100 lần).



Hình 3. Phôi nang lợn Ỉ nhân bản được nhuộm Hoescht 33342 để đánh giá tổng số tế bào/phôi (độ phóng đại 400 lần).

Trong nghiên cứu này, tỷ lệ hình thành phôi nang lợn Ỉ nhân bản của nhóm CHX là thấp hơn so với nhóm 6-DMAP và nhóm CyB (Bảng 1). Kết quả này cũng phù hợp với nhận định của Mario và đồng tác giả (2003), Kim và đồng tác giả (2005). Theo Mario và đồng tác giả (2003), tỷ lệ tạo phôi nang lợn nhân bản sau hoạt hóa với CHX (16,9%) mặc dù cao hơn nhóm không xử lý với CHX, nhưng tỷ lệ này vẫn thấp. Kim và đồng tác giả (2005) cũng nhận thấy việc sử dụng 6-DMAP trong quá trình hoạt hóa sẽ hỗ trợ sự phát triển *in vitro* tiếp theo của tế bào trứng sau hoạt hóa tốt hơn so với CHX.

Trong nghiên cứu này, đối với nhóm 6-DMAP, tế bào trứng lợn sau cấy chuyển nhân tế bào soma được hoạt hóa bằng một xung điện và xử lý với 2mM 6-DMAP trong vòng 3 giờ. 6-DMAP là một chất ức chế protein kinase, và được sử dụng rộng rãi cho quá trình hoạt hóa tế bào trứng động vật có vú vì nó có khả năng hỗ trợ quá trình hoạt hóa và hình thành tiền nhân (Moses *et al.*, 1995). Cơ chế hoạt động của 6-DMAP trong quá trình hoạt hóa tế bào trứng liên quan đến việc ngăn chặn hoạt động của các protein điều hòa chu kỳ như Mitogen activated

protein kinase (MAPK) (Park *et al.*, 2010). Theo Nanassy và đồng tác giả (2007), sau khi được hoạt hóa bằng xung điện, hoạt động MAPK của tế bào trứng lợn giảm đáng kể sau 1 giờ và đạt giá trị thấp nhất tại thời điểm 3 giờ. Tuy nhiên sau 4 giờ, hoạt động này sẽ tăng trở lại và duy trì ở mức cao cho tới thời điểm hình thành tiền nhân. Chính vì thế thời gian xử lý tế bào trứng sau cấy chuyển nhân tế bào soma với 6-DMAP thường dao động từ 3-4 giờ (Park *et al.*, 2010). Betthausen và đồng tác giả (2000) nhận thấy, khi sử dụng 6-DMAP cho quá trình hoạt hóa tế bào trứng sẽ tạo ra những kích thích làm suy giảm sự hoạt động của MPF. Sự suy giảm hoạt động MPF gây ra những tác động đến nhân tế bào cho, qua đó nâng cao hiệu quả tạo phôi động vật nhân bản.

Trong nghiên cứu của chúng tôi, tỷ lệ tế bào trứng phân chia sau hoạt hóa với 6-DMAP đạt 83,81% (Bảng 2). Theo Grupen và đồng tác giả (2002) khi xử lý tế bào trứng với 2 hoặc 5mM 6-DMAP trong vòng 3 giờ sau xung điện làm tăng tỷ lệ hình thành phôi nang. Hiệu quả của việc sử dụng 6-DMAP trong quá trình hoạt hóa sẽ được nâng cao khi sử dụng kết hợp kích thích xung điện với 6-DMAP. Wang và đồng tác giả (2016)

nhận thấy rằng việc chỉ sử dụng 6-DMAP mà không có kích thích xung điện trong quá trình hoạt hóa sẽ làm giảm khả năng phân chia và tạo phôi nang của tế bào trứng chuột đồng sau hoạt hóa. Theo các tác giả này khi chỉ sử dụng 6-DMAP cho quá trình hoạt hóa, tỷ lệ phân chia chỉ đạt 47,12%, trong khi đó nếu kết hợp kích thích bằng xung điện và 6-DMAP thì tỷ lệ phân chia lên tới 96,49%.

CyB là một chất hóa học có tác dụng ổn định bộ khung xương tế bào, ngăn chặn sự trùng hợp các vi sợi và sự hình thành thể cực thứ hai. Roy và đồng tác giả (2017) nhận thấy rằng, việc hoạt hóa tế bào trứng lợn với CyB sẽ cải thiện được khả năng phát triển tiếp theo của tế bào trứng lợn sau hoạt hóa. Trong nghiên cứu này khi sử dụng CyB hoặc 6-DMAP cho quá trình hoạt hóa tế bào trứng sau cấy chuyển nhân tế bào soma cho tỷ lệ hình thành phôi nang lợn Ỉ nhân bản cao hơn so với nhóm CHX. Tỷ lệ tạo phôi nang lợn Ỉ nhân bản của nhóm 6-DMAP và CyB là không khác nhau ($P < 0,05$, Bảng 2). Kết quả này cũng phù hợp với nghiên cứu của Grupen và đồng tác giả (2002). Theo Grupen và đồng tác giả (2002) việc hoạt hóa tế bào trứng lợn với 6-DMAP và CyB làm tăng tỷ lệ hình thành phôi nang.

Hiệu quả của việc sử dụng 6-DMAP và CyB so với CHX trong quá trình hoạt hóa tế bào trứng lợn sau cấy chuyển nhân tế bào soma còn thể hiện ở chất lượng phôi nang lợn Ỉ nhân bản. Trong nghiên cứu này, trung bình tổng số tế bào/phôi nang của nhóm 6-DMAP và nhóm CyB cao hơn so với nhóm CHX (theo thứ tự là 47,78 và 44,57 so với 39,42). Kết quả này phù hợp với báo cáo của Kim và đồng tác giả (2005). Theo Kim và đồng tác giả (2005), quá trình hoạt hóa tế bào trứng sau SCNT bằng xung điện và 6-DMAP sẽ hỗ trợ cho khả năng phát triển tiếp theo của tế bào trứng và tăng số lượng tế bào/phôi nang.

KẾT LUẬN

Việc sử dụng 6-DMAP hoặc CyB trong quá trình hoạt hóa tế bào trứng lợn sau cấy chuyển nhân tế bào soma cho tỷ lệ hình thành phôi nang lợn Ỉ nhân bản cao hơn so với CHX (theo thứ tự là 24,93% và 24,41% so với 15,01%). Lần đầu

tiên tại Việt Nam, đã tạo thành công phôi nang lợn Ỉ nhân bản không có màng sáng bằng kỹ thuật cấy chuyển nhân tế bào soma với tỷ lệ phôi nang dao động từ 15,01 - 24,93%.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu được thực hiện tại Phòng Thí nghiệm trọng điểm Công nghệ tế bào động vật – Viện Chăn nuôi với sự hỗ trợ kinh phí từ đề tài: “Nghiên cứu tạo lợn Ỉ bằng kỹ thuật cấy chuyển nhân tế bào soma”, thuộc Chương trình trọng điểm ứng dụng Công nghệ sinh học trong lĩnh vực nông nghiệp và phát triển nông thôn đến năm 2020 của Bộ Nông nghiệp và PTNT.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Akagi S, Adachi N, Matsukawa K, Kubo M and Takahashi S (2003) Developmental potential of bovine nuclear transfer embryos and postnatal survival rate of cloned calves produced by two different timings of fusion and activation. *Mol Reprod Dev* 66: 264-272.
- Bethhauser J, Forsberg E, Augenstein M, Chilids L, Eilertsen K, Enos J, Forsythe T, Golueke P, Jurgella G, Koppang R, Lesmeister T, Mallon K, Mell G, Misica P, Pace M, Pfister-Genskow M, Strelchenko N, Voelker G, Watt S, Thompson S, Bishop M (2000) Production of cloned pigs from *in vitro* system. *Nat Biotechnol* 18: 1055-1059.
- Boquest AC, Grupen CG, Harrison SJ, McIlfratrick SM, Ashman RJ, d'Apice AJF, Nottle MB (2002) Production of cloned pigs from cultured fetal fibroblast cells. *Biol Reprod* 66: 1283-1287.
- Cheng WM, Sun XL, An L, Zhu SE, Li XH, Li Y and Tian JH (2007) Effect of different parthenogenetic activation methods on the developmental competence of *in vitro* matured porcine oocytes. *Anim Biotechnol* 18: 131-141.
- De Sousa PA, Dobrinsky JR, Zhu J, Archibald AL, Ainslie A, Bosma W, Bowering J, Bracken J, Ferrier PM, Fletcher J, Gasparrini B, Harkness L, Johnston P, Ritchie M, Ritchie WA, Travers A, Albertini D, Dinnyes A, King TL and Wilmut I (2002) Somatic cell nuclear transfer in the pig, control of pronuclear formation and integration with improved methods for activation and maintenance of pregnancy. *Biol Reprod* 66: 642-650.
- Grupen CG, Mau JC, McIlfratrick SM, Maddocks S,

- Nottle MB (2002) Effect of 6-dimethylaminopurine on electrically activated *in vitro* matured porcine oocytes. *Mol Reprod Dev* 62: 387-396.
- Hosseini SM, Moulavi F, Asgari V, Shirazi A, Abazari-Kia A H, Ghanaei HR, Nasr-Esfahani MH (2013) Simple, fast, and efficient method of manual oocyte enucleation using a pulled Pasteur pipette. *In vitro Cell Dev Biol – Animal* DOI 10.1007/s11626-013-9630-4
- Inoue K, Noda S, Ogonuki N, Miki H, Inoue S, Katayama K, Mekada K, Miyoshi H and Ogura A (2007) Differential developmental ability of embryos cloned from tissue-specific stem cells. *Stem Cells* 25: 1279-1285.
- Kim YS, Lee SL, Ock SA, Balasubramanian S, Choe SY, Rho GJ (2005) Development of cloned pig embryos by nuclear transfer following different activation treatments. *Mol Reprod Dev* 70: 308-313.
- Lee SH, Kim DY, Nam DH, Hyun SH, Lee GS, Kim HS, Lee CK, Kang SK, Lee BC and Hwang WS (2004) Role of messenger RNA expression of platelet activating factor and its receptor in porcine *in vitro* fertilized and cloned embryo development. *Biol Reprod* 71: 919-925.
- Mario AMD, Masami S, Masumi K, Koji I and Yoshiyuki T (2003) Effects of cycloheximide treatment on *in vitro* development of porcine parthenotes and somatic cell nuclear transfer embryos. *Jpn J Vet Res* 50(4): 147-155.
- Moses RM, Kline D, Masui Y (1995) Maintenance of metaphase in colcemid-treated mouse eggs by distinct calcium and 6-dimethylaminopurine (6-DMAP) sensitive mechanisms. *Dev Biol* 167: 329-337.
- Nanassy L, Lee K, Javor A and Machaty Z (2007) Changes in MPF and MAPK activities in porcine oocytes activated by different methods. *Theriogenology* 68: 146-152.
- Nanassy L, Lee K, Javor A, Machaty Z (2008) Effects of activation methods and culture conditions on development of parthenogenetic porcine embryos. *Anim Reprod Sci* 104: 264-274.
- Park SJ, Koo OJ, Kwon DK, Gomez MNL, Kang JT, Atikuzzaman M, Kim SJ, Jang G and Lee BC (2010) Short-term treatment with 6-DMAP and demecolcine improves developmental competence of electrically or Thi/DTT-activated porcine parthenogenetic embryos. *Zygote* 19:1-8.
- Polejaeva IA, Chen SH, Vaught TD, Page RL, Mullins J, Ball S, Dai Y, Boone J, Walker S, Ayares DL, Colman A and Campbell KH (2000) Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cells. *Nature* 407, 86-90.
- Roy PK, Kim G, Fang X, Hassan BMS, De. Soysa M, Shin ST and Cho JK (2017) Optimization of post-activation system to improve the embryonic development in porcine parthenogenesis and somatic cell nuclear transfer. *J Emb Trans* 32(3): 95-104.
- Wakayama T and Yanagimachi R (2001) Mouse cloning with nucleus with nucleus donor cells of different age and type. *Mol Reprod Dev* 58: 376-383.
- Wang L, Jiang H and Li Z (2016) Effects of electrical pulse and 6-DMAP on cleavage of golden hamster oocytes-Morphological and physiological observations. *J Func Morphol Kinesiol* 1: 240-248.
- Yang XY, Zhao JG, Li HW, Li H, Liu HF, Huang SZ and Zeng YT (2005) Improving *in vivo* development of cloned bovine embryos with hybrid (Holstein-Chinese Yellow) recipient oocytes recovered by ovum pick up. *Theriogenology* 64: 1263-1272.

EFFECTS OF 6-DIMETHYLAMINOPURINE, CYTOCHALASIN B AND CYCLOHEXIMIDE ON *IN VITRO* DEVELOPMENT OF “I” PIG CLONED EMBRYOS

Nguyen Khanh Van, Quan Xuan Huu, Vu Thi Thu Huong, Pham Doan Lan

Key Laboratory of Animal Cell Biotechnology, National Institute of Animal Science

SUMMARY

The present study was conducted to evaluate the effects of 6-dimethylaminopurine (6-DMAP), cytochalasin B (CyB) and cycloheximide (CHX) on *in vitro* development of “I” pig somatic cell

nuclear transfer embryos. Oocytes after SCNT were activated with 2 mM 6-DAMP; 7.5 µg/ml CyB and 10 µg/ml CHX. The results indicated that the rate of oocytes no lysis in group activated by CHX was significantly lower compared with those in group activated by 6-DAMP and CyB (90.91% and 88.01%, respectively, $P < 0,05$). The blastocyst formation rate did not differ between group activated by 6-DAMP and CyB (24.93% vs 24.4%, $P > 0.05$). Meanwhile the blastocyst formation rate in group activated by CHX was 15.01%, significantly lower than that in group activated by 6-DAMP and CyB ($P < 0.05$). The average number of cells in the blastocyst in group activated by 6-DAMP and CyB were higher than that in group activated by CHX (47.78, 44.57 vs 39.42, respectively). The use of 6-DAMP and CyB in the activation of pig oocytes after SCNT was more effective than CHX. The results of this study show that for the first time in Vietnam, we have created “I” pig SCNT embryo without zona pellucida with the rate of blastocyst formation from 15.01% to 24.93%.

Keywords: *activation, 6-dimethylaminopurine, cytohalasin B, cycloheximide, pig oocytes, “I” SCNT embryos.*