BƯỚC ĐẦU THỤ TINH ỐNG NGHIỆM TẠO PHÔI CHÓ

Trần Thị Dân[1], Nguyễn Văn Út[1], Trương Thị Hoàng Diệu[1], Nguyễn Văn Thuận[2]
[1] Đại học Nông Lâm, TPHCM, 35128619
[2] Konkuk University, Korea

TÓM TẮT

Giống chó nội có đặc tính tốt trong việc giữ nhà và chăn đàn gia súc, do đó chúng cần được bảo tồn và nhân giống. Một khảo sát được thực hiện trên 763 noãn bào (trứng) thu thập tươi từ 27 chó thuộc giống nội ở các giai đoạn sinh sản khác nhau, qua đó ghi nhận tỷ lệ trứng thành thục trong môi trường nuôi NCSU37 được bổ sung 3 mức β-mercaptoethanol (chất chống oxy hoá), và đánh giá tỷ lệ thành công của thụ tinh ống nghiệm khi trứng được nuôi cấy trong 2 môi trường khác nhau (Fert-TALP và TYH). Tinh trùng được thu thập từ phó dịch hoàn và hoạt hoá bằng phương pháp bơi lên trong Sperm-TALP-1. Sự xuất hiện của tiền nhân (nhuộm) được xem là chỉ dẫn của thụ tinh thành công.

Tỷ lệ trứng thành thục khi môi trường NCSU37 được bổ sung β-mercaptoethanol với lượng 50μM đạt cao nhất (4,9%) so với liều 100μM hoặc đối chứng (không bổ sung). Sau khi thụ tinh trong ống nghiệm, tỷ lệ trứng có tiền nhân là 0,4% trong môi trường Fert-TALP trong khi tỷ lệ này là zero với môi trường TYH. Nhìn chung, tỷ lệ thành công khá thấp so với kết quả công bố bởi Yamada và ctv (1992), và Kim Kyu Min và ctv (2004).

1. MỞ ĐẦU

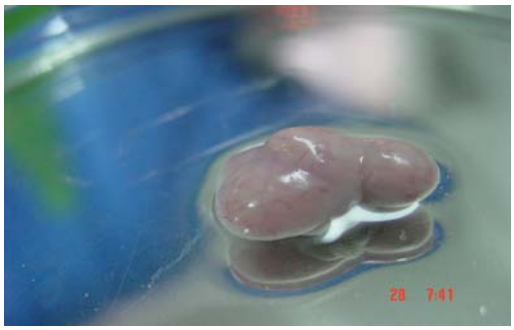
Phôi là vật liệu quan trọng để tạo nguồn động vật đồng loạt, phục vụ cho các thử nghiệm trong y học, nâng cao năng suất vật nuôi hoặc góp phần bảo tồn những loài động vật quý hiếm. Phôi còn là nguồn nguyên liệu khai thác tế bào gốc rất hiệu quả phục vụ trong việc cấy ghép nội tạng cho con người. Do đó, phôi cần được tạo trong ống nghiệm để có lượng lớn cần thiết với chất liệu di truyền kiểm soát được.

Trên thế giới đã có những thành tựu về thụ tinh ống nghiệm (*in vitro* fertilization - IVF) trên nhiều loài động vật (heo, bò, thỏ, dê, cừu, chó…). Tuy nhiên, chó là loài động vật có đặc điểm sinh lý rất khác biệt, do đó tỷ lệ trứng thành thục và tỷ lệ hình thành phôi trong ống nghiệm còn rất thấp, đây là vấn đề còn rất được quan tâm và nghiên cứu. Ở Việt Nam, công nghệ sinh học sinh sản mới được quan tâm trong thời gian gần đây, và chưa có nghiên cứu nào thực hiện trên chó. Mục tiêu của đề tài là tìm quy trình thụ tinh trong ống nghiệm phù hợp trên chó giống nội.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Đề tài được tiến hành từ 1/3/2007 đến 15/8/2007 tại phòng Nuôi cấy tế bào và phòng thí nghiệm Sinh Lý Sinh Hóa - khoa Chăn Nuôi Thú Y, ĐH Nông Lâm TPHCM. Nội dung nghiên cứu gồm cải thiện quy trình nuôi thành thục trứng ở các liều β-mercaptoethanol, và so sánh hiệu quả khi tiến hành thụ tinh ở hai môi trường TYH và Fert-TALP.

Buồng trứng và tinh trùng từ phần đuôi phó tinh hoàn được lấy ở lò mổ.



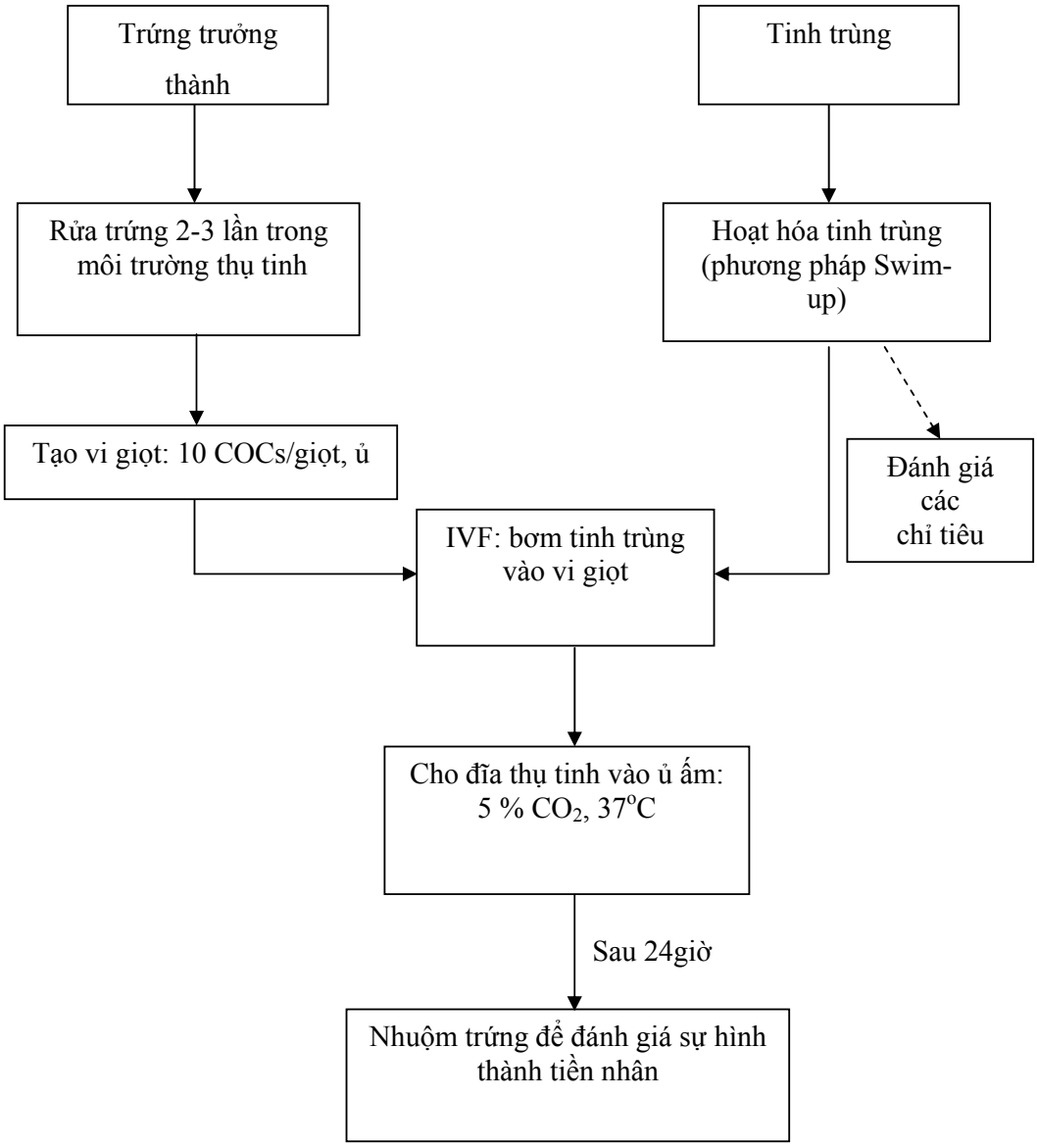
Hình 1. Buồng trứng chó dùng thu thập trứng Phó dịch hoàn chó để thu tinh trùng

Buồng trứng được bảo quản trong dung dịch đệm PBS, sau đó đưa vào dung dịch HEPES-buffered-Tyrodes (HEPES-TL-PVA) để cắt và thu nhận trứng (phức hợp trứng - tế bào cumulus). Môi trường NCSU 37 được dùng để nuôi trứng thành thục, trong đó bổ sung thêm kích thích tố FSH, estradiol, hCG, FBS và β-mercaptoethanol.

Thí nghiệm 1 được tiến hành trong giai đoạn nuôi trứng thành thục (trứng đạt đến kỳ giữa metaphase II). Yếu tố thí nghiệm là liều β-mercaptoethanol bổ sung vào môi trường, gồm 3 mức: 0, 50 và 100 µM. Mỗi mức β-mercaptoethanol có 10 mẫu với tổng số trứng khảo sát trong khoảng 249-259/mức. Trứng được nuôi cùng với tế bào cumulus (10 phức hợp trứng-cumulus trong mỗi giọt 100µl môi trường) trong 72 giờ ở điều kiện 5%CO_2 , 37^oC. Chỉ tiêu đánh giá là tỷ lệ trứng thành thục sau 72 giờ nuôi (nhuộm bằng orcein).

Trứng thành thục ở metaphase II được thụ tinh *in vitro* bởi tinh trùng thu nhận từ phần đuôi phó tinh hoàn. Trước khi thụ tinh, tinh trùng được hoạt hoá bằng phương pháp bơi lên trong môi trường Sperm-TALP (ủ ở 5 % CO_2, 37^oC trong 60 phút).

Thí nghiệm 2 được thực hiện với hai loại môi trường dùng trong thụ tinh, gồm môi trường Fert-TALP và TYH. Quy trình thực hiện được điều chỉnh dựa theo tài liệu của Yamada và ctv (1992), Kim và ctv (2004). Thụ tinh trong vi giọt (44µl/giọt với môi trường Fert-TALP, 100µl/giọt với môi trường TYH). Lượng tinh trùng hoạt hoá là 2µl/giọt (nồng độ 2,5x10^7 tế bào/ml) ở giọt môi trường Fert-TALP, và 10µl/giọt (nồng độ 10^7 tế bào/ml) ở giọt môi trường TYH.



Sơ đồ 1. Quy trình thụ tinh

Ghi chú: COC = phức hợp trứng - tế bào cumulus

Các chỉ tiêu đánh giá tình trạng tinh trùng trước khi thụ tinh gồm hoạt lực tinh trùng, tỷ lệ tinh trùng sống/chết, và nồng độ tinh trùng.

Thụ tinh xảy ra trong tủ ấm 5 % CO_2, 37^oC trong 24 giờ. Sự xuất hiện của tiền nhân (nhuộm bằng orcein) được xem là chỉ dẫn của thụ tinh thành công.

Xử lý thống kê bằng trắc nghiệm ANOVA sau khi chuyển dạng arcsin ở phần mềm Stagraphic 7.0. Kết quả được trình bày dưới dạng $\overline{X} \pm SE$.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1 Nồng độ β-mercaptoethanol trong thí nghiệm nuôi thành thục trứng

β-mercaptoethanol có vai trò cải thiện tỷ lệ trứng thành thục và phát triển phôi ở một số loài động vật vì chất này có vai trò gián tiếp trong việc tổng hợp glutathione (GSH) - một hợp chất quan trọng bảo vệ tế bào khỏi các tác nhân oxy hóa.

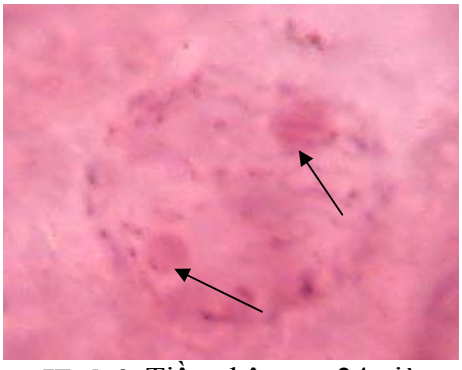
Bảng 1. Tỷ lệ trứng thành thục ở các nồng độ β-mercaptoethanol

Nồng độ β-mercaptoethanol (μM)	Số lô	Số trứng nuôi	Tỷ lệ trứng thành thục (%)	P
0	10	249	$1,3 \pm 0,54^a$	0,02
50	10	259	$4,88 \pm 1,37^b$	
100	10	255	$1,65 \pm 0,6^a$	

β-mercaptoethanol đóng vai trò như một chất đồng xúc tác, giúp tăng cường tổng hợp glutathione (GSH) nội bào, mà GSH có vai trò phân hủy các chất oxy hóa trong môi trường, tăng cường vận chuyển axít amin và đẩy mạnh quá trình tổng hợp DNA, protein trong tế bào,…(Kim và ctv, 2004). Do đó, trứng sẽ phát triển tốt và đạt tỷ lệ thành thục cao khi bổ sung chất này. Tuy nhiên, nồng độ GSH quá cao sẽ làm mất cân bằng thành phần của các chất trong môi trường nội bào, gây ảnh hưởng xấu đến sự phát triển của trứng. Do vậy, khi bổ sung β-mercaptoethanol với nồng độ 100μM đã cho tỷ lệ trứng thành thục thấp hơn so với 50μM.

Kết quả của chúng tôi thấp hơn của Kim và ctv (2004), có thể do ảnh hưởng của rất nhiều yếu tố trong quá trình nuôi trứng. Trứng được lấy từ chó cái ở nhiều giai đoạn sinh sản khác nhau nên chất lượng trứng không đồng nhất, và có thể do nhiễm khuẩn trong quá trình nuôi cấy làm ảnh hưởng xấu đến sự phát triển của trứng. Nhiễm khuẩn là vấn đề rất khó giải quyết. Mặt khác, nguồn mẫu được lấy trực tiếp từ lò mổ nên nguy cơ nhiễm là rất cao.

3. So sánh hiệu quả thụ tinh trong môi trường Fert- TALP và TYH



Hình 2. Tiền nhân sau 24 giờ

Tỷ lệ hình thành tiền nhân trong khảo sát của chúng tôi rất thấp so với kết quả của Yamada và ctv (1992) và Kim và ctv (2004). Trong môi trường TYH không có kết quả tạo thành tiền nhân, trong khi dùng môi trường Fert-TALP thì chỉ có một tiền nhân được hình thành trong tổng số trứng khảo sát. Một số nguyên nhân có thể làm cho tỷ lệ thụ tinh thấp:

- Tỷ lệ trứng thành thục thấp.
- Lớp lipid trong nội chất của trứng chó khá nhiều, do đó rất khó quan sát được thể cực sau 72 giờ nuôi nên hầu hết trứng sau khi nuôi được đánh giá theo kinh nghiệm.
- Tinh trùng trong thí nghiệm lấy trực tiếp từ phần đuôi phó dịch hoàn của những chó đực từ lò mổ nên chất lượng tinh trùng không ổn định (nồng độ và hoạt lực), có thể là do chó đực bị nhốt một vài ngày trước khi mổ nên dễ bị stress, ngoài ra trong thời gian đó chó còn bị bỏ đói… đã ảnh hưởng rất lớn đến khả năng sinh tinh và chất lượng của tinh trùng. Do đó, nồng độ và hoạt lực tinh trùng sau khi hoạt hóa thường không cao và có khi thấp hơn nồng độ cần cho thụ tinh rất nhiều.
- Trong môi trường thụ tinh của chúng tôi thiếu thành phần PHE stock so với môi trường thụ tinh của Kim và ctv (2004), vì trong PHE stock có hypotaurine là yếu tố bảo vệ áp suất thẩm thấu trong môi trường.
- Dễ bị tạp nhiễm trong thao tác.

Đặc tính sinh lý sinh sản của chó rất khác với những loài khác. Do đó, tỷ lệ trứng thành thục trong ống nghiệm và hình thành phôi trong IVF rất thấp. Mặt khác, theo khảo sát sau đó của chúng tôi, tỷ lệ trứng thu được và tỷ lệ trứng chín cao nhất ở giai đoạn nang noãn có xoang, do đó có lẽ nên chọn những chó trong giai đoạn động dục hoặc trước động dục.

4. KẾT LUẬN

Bổ sung β-mercaptoethanol vào môi trường nuôi trứng đã tăng tỷ lệ trứng thành thục; đạt 1,3% khi không bổ sung, 4,88% khi bổ sung 50µM, và 1,65% khi bổ sung 100µM.

Tỷ lệ trứng thụ tinh còn thấp, trong môi trường Fert-TALP là 0,4% và trong môi trường TYH là 0%.

5. ĐỀ NGHỊ

Nên bổ sung β-mercaptoethanol với nồng độ 50 µM vào môi trường nuôi trứng.

Bổ sung thành phần PHE stock (2µl/giọt) vào môi trường thụ tinh.

Thử nghiệm quy trình tạo phôi chó với môi trường TYH cho tất cả các giai đoạn nuôi trứng, hoạt hóa tinh trùng, thụ tinh và nuôi phôi.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

[1] Kim Kyu Min, Fibrianto Heru Yuda, Oh Ju Hyun, Jang Goo, Kim Jin Hye, Lee Seung Kyu, Kang Keun Sung, Lee Chun Byeong and Hwang Suk Woo, 2004. Effect of β-mercaptoethanol or epidermal growth factor supplementation on in vitro maturation of canine oocytes collected from dogs with different stages of the estrus cycle. *J. Vet. Sci* **5 (3)**: 253-258.

[2] Yamada S., Shimazu Y., Kawaji H., Nakazawa M., Naito K. and Toyoda Y., 1992. Maturation, fertilization, and development of dog oocyte in vitro. *Biology of reproduction* **46**: 853-858.