NGHIÊN CỨU ỨNG DỤNG KỸ THUẬT SIÊU ÂM THU TẾ BÀO TRỨNG TỪ BÒ SỐNG ĐỂ TẠO PHÔI TRONG ỐNG NGHIỆM

Nguyễn Văn Lý*, Lưu Công Khánh, Nguyễn Thị Thoa, Phan Lê Sơn, Chu Thị Yến, Nguyễn Thị Kim Anh và Vũ Ngọc Hiệu
Bộ môn cấy truyền phôi

Abstract

The experiment was conducted on 3 dairy cross-breed cows with 64 Ovum Pick-up sessions. Among 359 observed follicles with diameter ≤8mm, 255 oocytes were aspirated with the average of 3.98 oocytes per ovary and the oocytes classified as grade A, B, C were 36.08±2.04; 24.31±24.31 and 13.33±2.12%, respectively. There was significant difference between oocytes graded as A, B and C ($P<0.05$). From 188 oocytes matured for 22h in vitro, 71.28±0.95% oocytes were matured. After incubation with sperm for 5h, 66.4% oocytes were inseminated. From those, 53.73±2.01% zygotes cleaved and 40.30±1.57% zygotes developed to morula and blastocyst stages. Among 20 in vitro produced embryos were transferred, 4 calves (20%) were born. It is conluded that, Ovum Pick-up was first applied sussessful in Vietnam to produce dairy embryos with high quality.

Key words: Ovum Pick-up

ĐẶT VẤN ĐỀ

Ngày nay, với sự phát triển của khoa học kỹ thuật, một kỹ thuật mới có thể thay thế được kỹ thuật gây rụng trứng nhiều là kỹ thuật thụ tinh ống nghiệm (TTON).

Trên thế giới, TTON đã được nghiên cứu từ những năm đầu của thế kỷ trước và con thỏ đầu tiên ra đời bằng kỹ thuật này vào năm 1959, em bé TTON đầu tiên ra đời năm 1978 tại Anh và con bê TTON đầu tiên ra đời năm 1981 tại Mỹ.

Tại Việt Nam, TTON bằng buồng trứng bò lấy từ lò mổ đã được nghiên cứu từ đầu những năm 1990 của thế kỷ trước (Bùi Xuân Nguyên và cs, 1994, 1997; Nguyễn Thị Ước và cs, 1996, 1999, 2003; Nguyễn Hữu Đức và cs, 1996, 1998, 2003; Nguyễn Văn Lý và cs, 2003).

Với mục đích tạo phôi trong ống nghiệm có chất lượng cao phục vụ cho sản xuất, chúng tôi đã tiến hành đề tài "Nghiên cứu ứng dụng kỹ thuật siêu âm thu tế bào trứng từ bò sống để tạo phôi trong ống nghiệm**".**

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

VẬT LIỆU

- Bò dùng để siêu âm hút tế bào trứng là bò lai hướng sữa (F2, F3) (n=3), có năng suất sữa trên 4500 lít/chu kỳ, thể trọng 350 - 400kg, điểm thể trạng 2,5 – 3. Những bò này được cho ăn 30kg cỏ tươi và 3kg thức ăn tinh/ngày và được nuôi nhốt tại Trạm nghiên cứu thử nghiệm thức ăn chăn nuôi - Viện Chăn nuôi.
- Tinh cọng rạ HF nhập từ Mỹ có hoạt lực trên 40%, có năng suất sữa trên 10.000 lít/chu kỳ. Loại tinh này đã được kiểm tra năng suất qua đời sau.

* Tác giả chính: Nguyễn Văn Lý, Điện thoại: (04) 8 386 128 / 0913030090; Fax (04) 8 389 775;
E-mail: nguyenvanly@hotmail.com
Ngày nhận bài: ; Ngày được chấp nhận:

- Bò nhận phôi là bò Lai Sind và bò lai hướng sữa (F2, F3) có thể trọng >250kg, có chu kỳ sinh lý sinh sản bình thường và không mắc các bệnh về đường sinh dục.

PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Những con bò tốt đã được chọn lựa về mặt di truyền sẽ được sử dụng máy siêu âm hoặc khám qua trực tràng để xác định khả năng cho tế bào trứng, từ đó tiến hành thu tế bào trứng. Hút tế bào trứng được thực hiện mỗi tuần một lần.

Quá trình hút tế bào trứng được tiến hành như sau:

Cho bò vào giá cố định, lấy hết phân ra, rửa sạch, sát khuẩn âm hộ và khu vực xung quanh.

Chuẩn bị hệ thống máy siêu âm, nối đầu dò âm đạo vào máy siêu âm. Nối kim hút tế bào trứng (kim 16G dài 55 cm), đặt máy tạo áp suất ở 120 mmHg, tương đương tốc độ dòng chảy 25 ml/phút. Chuẩn bị môi trường hút tế bào trứng (mDPBS của Sigma) có bổ sung 50 iu/ml heparin và 5% huyết thanh bê và kháng sinh (100.000iu pennicilin/ml + 100µl streptomycin/ml) duy trì ở nhiệt độ 37^0C bằng máy ổn nhiệt.

Nhẹ nhàng cho đầu dò siêu âm có gắn hệ thống dẫn kim vào âm đạo, cho tay qua trực tràng xác định vị trí của buồng trứng, vị trí các nang trứng rồi đưa buồng trứng về phía đầu quét của đầu dò, quan sát các nang trứng trên màn hình máy siêu âm, đếm số nang trứng có mặt trên buồng trứng, Trước khi hút dịch nang trứng, hút một ít dung dịch hút trứng để làm trơn hệ thống kim và ống dẫn.

Sau khi chọc hút 2 - 4 nang trứng, rút kim ra, hút dung dịch thu tế bào trứng để tế bào trứng chảy vào ống falcon, tiến hành hút lặp lại đến khi không còn nhìn thấy nang trứng nào trên buồng trứng thì chuyển qua buồng trứng đối diện. Dịch hút được thu vào ống ly tâm 50ml và duy trì ở nhiệt độ 37^0C bằng máy ổn nhiệt. Sau khi hút xong một buồng trứng, đưa ngay về phòng thí nghiệm, lọc bằng cốc lọc Emcon có đường kính lỗ lọc 20µm, khoảng 10ml dung dịch còn lại được chuyển vào đĩa petri vô trùng có đường kính 90mm để soi tìm tế bào trứng dưới kính hiển vi soi nổi. Tế bào trứng thu được được đánh giá phân loại theo phương pháp của Wright và Lindner (1989).

Sau khi đánh giá phân loại, tế bào trứng được nuôi thành thục trong môi trường TCM-199 có bổ sung 5% huyết thanh bê mới sinh trong 24 giờ, tiếp theo chúng được chuyển qua môi trường thụ tinh BO với mật độ tinh trùng $6,25x10^6$/ml trong 5 giờ. Sau quá trình thụ tinh, hợp tử được tách tế bào cumulus và chuyển sang nuôi trong môi trường nuôi CR1 có bổ sung axit amin, huyết thanh bê mới sinh và albumin huyết thanh bò. Sau 7 ngày nuôi, những phôi dâu, phôi nang có chất lượng tốt được lựa chọn để cấy cho bò nhận động dục đồng pha.

Sau 3 tháng, khám thai qua trực tràng để xác định tỷ lệ có chửa.

Số liệu được xử lý theo phương pháp thống kê sinh học có sử dụng phần mềm Excel version 5.0 và Minitab Release 12.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

KẾT QUẢ THU TẾ BÀO TRỨNG TỪ BÒ SỐNG

Trong tổng số 64 lượt buồng trứng bò sống được thu tế bào trứng bằng phương pháp siêu âm, số nang trứng có đường kính ≤8mm quan sát được là 359 và tổng số tế bào trứng thu được là 255, trung bình thu được 3,98 tế bào trứng/buồng trứng. Tỷ lệ thu tế bào trứng đạt 71,03% (bảng 1).

Bảng 1: Thu tế bào trứng từ bò sống bằng kỹ thuật siêu âm

Chỉ tiêu	Kết quả

Số lượt buồng trứng thí nghiệm	64
Số nang trứng có đường kính ≤ 8mm	359
Số nang trứng trung bình/buồng trứng (Mean ± SE)	5,61 ± 2,03
Tổng số tế bào trứng thu được	255
Tế bào trứng thu được/buồng trứng (Mean ± SE)	3,98 ± 3,21
Tỷ lệ tế bào trứng thu được (%) (Mean± SE)	71,03 ± 1,32

Số nang trứng trung bình/buồng trứng trong thí nghiệm của chúng tôi thấp hơn so với số nang trứng trung bình/buồng trứng trong báo cáo của Rizos và cs. (2005) ở cả bò hậu bị và bò cái sau đẻ (10,4 và 7,8 nang trứng/buồng trứng, tương ứng). Tuy nhiên, số tế bào trứng trung bình thu được/buồng trứng trong thí nghiệm của chúng tôi không sai khác nhiều so với kết quả các tác giả này (3,98 so với 4,7 ở bò hậu bị và 2,8 ở bò sau đẻ). Do vậy, tỷ lệ thu tế bào trứng của chúng tôi cao hơn so với tỷ lệ của các tác giả này đã báo cáo (71,03% so với 45,4% ở bò hậu bị và 36,0% ở bò sau đẻ).

Tuy nhiên, kết quả thu được của chúng tôi còn thấp hơn kết quả của một số tác giả khác đã báo cáo. Số lượng nang trứng trung bình được chọc hút và số tế bào trứng trung bình thu được ở mỗi lần siêu âm của De Roover và cs. (2005) cao hơn kết quả của chúng tôi (11,9 nang trứng và 5,6 tế bào trứng so với 5,61 nang trứng và 3,98 tế bào trứng). Theo Reis và cs. (2002), từ 24 bò hậu bị, bằng phương pháp siêu âm hút tế bào trứng lặp lại, các tác giả đã tiến hành chọc hút 8 lần trong tổng số 3234 nang trứng và thu được 1241 tế bào trứng (38,4% tương ứng). Trung bình thu được 7,2 tế bào trứng/bò/lần siêu âm thứ nhất và 5,7 tế bào trứng/bò/lần siêu âm lặp lại. Viana và cs. (2004) đã sử dụng 2 quy trình siêu âm hút tế bào trứng từ bò cái Gir và thấy rằng số lượng tế bào trứng thu được ở quy trình siêu âm 1lần/tuần là 8,9 tế bào trứng (chọc hút trên 11,6 nang) lớn hơn ở quy trình siêu âm 2lần/tuần là 7,0 tế bào trứng (chọc hút trên 12,1 nang) điều này tương ứng với tỷ lệ thu tế bào trứng ở quy trình thứ nhất là lớn hơn ở quy trình thứ hai (74,3% so với 59,0%). Như vậy, ở quy trình siêu âm 1lần/tuần tỷ lệ thu tế bào trứng của các tác giả là cao hơn của chúng tôi (74,3% so với 71,03%) còn ở quy trình siêu âm thứ 2lần/tuần tỷ lệ thu tế bào trứng của các tác giả lại cho kết quả thấp hơn của chúng tôi (59,0% so với 71,03%).

KẾT QUẢ PHÂN LOẠI TẾ BÀO TRỨNG THU ĐƯỢC TỪ BÒ SỐNG

Sau khi thu được, tế bào trứng được chọn lọc, phân loại theo phương pháp của Loos và cs. (1989). Kết quả phân loại tế bào trứng được trình bày ở bảng 2.

Bảng 2 cho thấy có sự khác nhau về tỷ lệ tế bào trứng thu được. Chất lượng tế bào trứng loại A là cao nhất, chiếm tỷ lệ 36,08% (92/255 tế bào trứng), tiếp theo là tế bào trứng loại B và D (24,31% và 26,28% tương ứng); tỷ lệ tế bào trứng loại C thu được là thấp nhất, đạt 13,33%. Như vậy, tế bào trứng đủ tiêu chuẩn nuôi cấy đạt 73,73% (188/255). Tỷ lệ tế bào trứng loại A và B của chúng tôi cao hơn so với kết quả của một số tác giả khác đã báo cáo. Tỷ lệ tế bào trứng loại A và B của chúng tôi (60,39%; 154/255) cao hơn tỷ lệ tế bào trứng loại I và II của các Viana và cs. (2004) khi sử dụng quy trình siêu âm mỗi tuần một lần (29,0%) và 2 lần một tuần (35%). Tuy nhiên, kết quả của chúng tôi không sai khác nhiều so với kết quả của Reis và cs. (2002) đã báo cáo. Theo các tác giả này, tỷ lệ tế bào trứng loại I và II thu được ở lần siêu âm 1 và 2 tương ứng là 54,9% và 46,8%.

Bảng 2: Phân loại chất lượng tế bào trứng thu được bằng siêu âm.

Chất lượng tế bào trứng	Tế bào trứng thu được	
	n	(Mean ± SE)
Loại A (%)	92	$36,08^{a} \pm 2,04$
Loại B (%)	62	$24,31^{b} \pm 1,93$
Loại C (%)	34	$13,33^{c} \pm 2,12$
Loại D (%)	67	$26,28^{d} \pm 1,68$
Chung	255	100,0

^{abcd}*Các chữ cái cùng cột khác nhau, giá trị sai khác có ý nghĩa (P<0,05)*

KẾT QUẢ TẠO PHÔI TỪ TẾ BÀO TRỨNG BÒ SỐNG VÀ CẤY PHÔI

Từ 188 tế bào trứng loại A, B và C thu được từ bò sống bằng kỹ thuật siêu âm, đã có 134 (71,28%) tế bào trứng thành thục, 89 (66,4%) tế bào trứng thụ tinh, 72 (52,72%) hợp tử phân chia và 54 (40,30%) phôi dâu/phôi nang loại A, B và C thu được. Trong 20 phôi dâu/phôi nang loại A và B được cấy cho bò nhận động dục đồng pha, đã có 6 trường hợp có chửa, đạt tỷ lệ 30,0% và đã có 4 bê ra đời (bảng 3).

Bảng 3: Kết quả tạo phôi và cấy phôi tạo ra bằng tế bào trứng thu từ bò sống bằng kỹ thuật siêu âm

Chỉ tiêu	Kết quả
Số tế bào trứng đem nuôi in vitro (n)	188
Tế bào trứng đã thành thục in vitro (%) (n; Mean ± SE)	134 (71,28±0,95)
Tế bào trứng thụ tinh in vitro (%) (n; Mean ± SE)	89 (66,4±1,23)
Hợp tử phân chia (%) (n; Mean ± SE)	72 (53,73±2,01)
Hợp tử phát triển đến phôi dâu/ phôi nang (%) (n; Mean ± SE)	54 (40,30±1,57)
Số phôi tạo ra được cấy cho bò nhận động dục đồng pha (n)	20
Bò có chửa (n, %)	6 (30,0%)
Bò đã đẻ (n, %)	4 (20,0%)

Tỷ lệ hợp tử phân chia (53,73%) trong thí nghiệm của chúng tôi cao hơn kết quả của Rizos và cs. (2005) đã báo cáo (48,7% từ tế bào trứng bò cái và 45,7% từ tế bào trứng bò hậu bị). Tuy nhiên, kết quả của chúng tôi còn thấp hơn so với kết quả phân chia của một số tác giả khác đã báo cáo khi sử dụng tế bào trứng thu từ bò sống (Galli và cs., 2001: 64,4%; Reis và cs., 2002: 81,1%; Rizos và cs., 2005: 80,8%). Tỷ lệ phôi dâu, phôi nang thu được trong thí nghiệm của chúng tôi (40,30%) cao hơn tỷ lệ của của Galli và cs. (2001) (25,39%) nhưng thấp hơn của Rizos và cs. (2005) (33,3% phôi nang ở bò hậu bị và và 46,5% phôi nang ở bò cái) đã báo cáo. Tỷ lệ có chửa 30,0% thấp hơn so với kết quả có chửa của Galli và cs. (2001) đã báo cáo (55,4%).

KẾT LUẬN

Với việc khai thác thành công tế bào trứng từ bò sống, tạo phôi trong ống nghiệm và cấy phôi thành công đã mở ra nhiều hứa hẹn trong việc khai thác tiềm năng di truyền của những bò cái sữa cao sản, hạ giá thành phôi để phục vụ cho sản xuất. Thụ tinh trong ống nghiệm bằng tế bào trứng lấy từ bò sống kết hợp với cấy truyền phôi sẽ góp phần nâng cao hiệu quả của công nghệ phôi tại Việt Nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Bùi Xuân Nguyên, Nguyễn Hữu Đức, Lê Văn Ty, Nguyễn Thị Ước (1994). Kết quả bước đầu nghiên cứu nuôi trứng và thụ tinh in vitro trâu bò. Kỷ yếu Viện Công nghệ sinh học 1994. NXB Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội: 166-168.

Bùi Xuân Nguyên, Nguyễn Hữu Đức, Lê Văn Ty, Nguyễn Thị ước (1997). Khảo sát khả năng cung cấp trứng để thụ tinh in vitro: nghiên cứu so sánh ở trâu và bò nội. Kỷ yếu Viện Công nghệ sinh học 1997. NXB Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội: 510-517.

De Roover, R., Genicot, G., Leonard, S., Bols, P. and Dessy, F. (2005). Ovum pick up and in vitro embryo production in cows superstimulated with an individually adapted superstimulation protocol. Animal Reproduction Science 86: 13 – 25.

Galli, C; Crotti, G; Notari, C; Turini, P; Duchi, R; Lazzari, G. (2001). Embryo Production by ovum pick up from live donors. Theriogenology 55: 1341-1357.

Nguyễn Hữu Đức, Nguyễn Thị Ước, Bùi Xuân Nguyên (1996). Trạng thái phát triển nhân tế bào trứng thu từ buồng trứng của bò nội Việt Nam. Kỷ yếu Viện công nghệ sinh học 1996.

Nguyễn Hữu Đức, Nguyễn Thị ước, Lê Văn Ty, Bùi Linh Chi, Bùi Xuân Nguyên (1998). Nghiên cứu chọn lọc tinh trùng bò dùng trong thụ tinh ống nghiệm. Kỷ yếu Viện Công nghệ sinh học 1998. NXB Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội: 169-174.

Nguyễn Hữu Đức, Nguyễn Thị ước, Lê Văn Ty, Quản Xuân Hữu, Nguyễn Trung Thành, Bùi Linh Chi, Nguyễn Văn Hạnh, Nguyễn Thuỳ 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. NXB 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, Quản 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 cấy phôi thụ tinh ống nghiệm và xác định giới tính. Hội nghị công nghệ sinh học toàn Quốc. NXB 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 ống nghiệm. Hội nghị công nghệ sinh học toàn Quốc. NXB Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội : 934-936.

Nguyễn Thị Ước, Nguyễn Hữu Đức, Lê Văn Ty, Bùi Xuân Nguyên (1996). Sự chín nhân ở tế bào trứng trâu đầm lầy nuôi in-vitro trong môi trường M 199 có bổ sung FSH và estradiol-17B. Kỷ yếu 1996, Viện công nghệ sinh học.

Nguyễn Văn Lý, Nguyễn Thị Thoa, Lưu Công Khánh, Phan Lê Sơn, Đặng Vũ Hoà, Chu Thị Yến, Hoàng Kim Giao, Đỗ Kim Tuyên (2003). Nghiên cứu tạo đàn bê bằng phôi thụ tinh ống nghiệm. Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc. NXB Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội: 598-602.

Reis , A., Steines, M.E., Watt, R.G., Dolman, D.F., McEvoy, T.G. (2002) Embryo production using defined oocyte maturation and zygote culture media following repeated ovum pick-up (OPU) from FSH-stimulated Simmental heifers. Animal Reproduction Science 72: 137-151.

Rizos, D., Burke, L., Duffy, P., Wade, M., Mee, J.F., O'Farrell, K.J., MarSiurtain, M., Boland, M.P. and Lonergan, P. (2005) Comparisons between nulliparous heifers and cows as oocyte donors for embryo production in vitrro. Theriogenology 63: 939-949.

Viana, J.H.M., Camargo, L.S.A., Ferreira, A.M., de Sa., W.F., Fernandes, C.A.C., Junior, A.P.M. (2004) Short intervals between ultrasonographically guided follicle aspiration improve oocyte quality but do not prevent establishment of dominant follicles in the Gir breed (Bos indicus) of cattle. Animal Reproduction Science 84: 1-12../.