

Ảnh hưởng của việc loại bỏ zona pellucida đến hiệu quả tạo phôi lợn Ỉ nhân bản

Nguyễn Khánh Vân, Quấn Xuân Hữu, Nguyễn Thị Hương, Vũ Thị Thu Hương,
Hoàng Thị Âu, Phạm Thị Kim Yến, Phạm Doãn Lân*

Phòng thí nghiệm trọng điểm công nghệ tế bào động vật, Viện Chăn nuôi

Ngày nhận bài 1/7/2020; ngày chuyển phản biện 3/7/2020; ngày nhận phản biện 30/7/2020; ngày chấp nhận đăng 10/8/2020

Tóm tắt:

Mục tiêu của nghiên cứu nhằm đánh giá ảnh hưởng của việc loại bỏ màng sáng (zona pellucida - ZP) đến hiệu quả tạo phôi lợn Ỉ nhân bản. Nghiên cứu sử dụng hai loại tế bào trứng có ZP và đã loại bỏ ZP cho quá trình tạo phôi lợn Ỉ nhân bản. Kết quả cho thấy, tỷ lệ tế bào trứng nguyên vẹn sau loại nhân, tế bào trứng được loại nhân thành công của nhóm đã loại bỏ ZP (tương ứng là 96,19 và 86,28%) cao hơn so với nhóm có ZP (tương ứng 83,92 và 82,19%); tuy nhiên sự sai khác về tỷ lệ loại nhân thành công giữa nhóm đã loại bỏ ZP và có ZP không có ý nghĩa (tương ứng 86,28 so với 82,19%, $p>0,05$). Các tế bào trứng sau loại nhân thành công được cấy chuyển nhân tế bào soma (SCNT) lợn Ỉ, dung hợp, hoạt hóa bằng cytochalasin B (7,5 $\mu\text{g/ml}$) và nuôi *in vitro* trong môi trường PZM3 để đánh giá hiệu quả tạo phôi. Tỷ lệ phôi có phân chia và tỷ lệ tạo phôi nang của nhóm tế bào trứng đã loại bỏ ZP cao hơn có ý nghĩa so với nhóm có ZP, tương ứng là 84,98 so với 71,84% và 24,41 so với 16,03% ($p<0,05$). Kết quả cho thấy, việc loại bỏ ZP giúp nâng cao hiệu quả tạo phôi lợn Ỉ nhân bản.

Từ khóa: cấy chuyển nhân tế bào soma, phôi lợn Ỉ nhân bản có zona pellucida, phôi lợn Ỉ nhân bản đã loại bỏ zona pellucida, zona pellucida.

Chỉ số phân loại: 4.6

Đặt vấn đề

Lợn Ỉ không chỉ có giá trị trong chăn nuôi mà còn cả trong lĩnh vực nghiên cứu y sinh. Lợn được hy vọng sử dụng trong cấy ghép nội tạng cho người vì có một số đặc điểm giải phẫu và sinh lý tương đồng với người. Polejaeva và cs (2000) [1] lần đầu tiên báo cáo về việc tạo được lợn con nhân bản bằng kỹ thuật SCNT. Từ đó đến nay đã có thêm nhiều báo cáo về việc tạo lợn biến đổi gen và lợn nhân bản, tuy nhiên hiệu quả nhân bản ở lợn vẫn thấp hơn so với các loài khác. Để nâng cao hiệu quả tạo lợn nhân bản, các nhà nghiên cứu đã cố gắng cải thiện một số yếu tố ảnh hưởng đến sự thành công của quá trình này như: loại nhân tế bào, gây động dục đồng pha, tạo phôi lợn nhân bản... Hiện nay phương pháp tạo phôi đã loại bỏ ZP được áp dụng nhằm cải thiện hiệu quả tạo phôi nhân bản ở một số động vật như bò [2], ngựa [3], lợn [4].

Phương pháp tạo phôi nhân bản từ trứng đã loại bỏ ZP là phương pháp đơn giản, hiệu quả, dễ sử dụng so với phương pháp tạo phôi nhân bản truyền thống [5]. Quá trình chuẩn bị loại nhân tế bào trứng đã loại bỏ ZP được thực hiện mà không cần nhuộm huỳnh quang đạt hiệu quả lên tới 95-100%, bảo tồn được 96-97% thể tích nguyên bào trứng sau loại nhân [6]. Tỷ lệ phôi nang nhân bản phát triển từ

cấy nhân nguyên bào trứng đã loại bỏ ZP được tạo ra bằng hoặc cao hơn so với phương pháp tạo phôi nhân bản truyền thống. Kết quả cấy chuyển phôi nhân bản vào lợn mẹ nhận phôi cũng có quy luật tương tự [7].

Tại Việt Nam, lợn Ỉ nằm trong danh mục giống vật nuôi cần được bảo tồn gấp bởi sự suy giảm nhanh về số lượng trong những năm gần đây. Tạo phôi lợn Ỉ nhân bản thành công có ý nghĩa lớn trong việc bảo tồn và gìn giữ nguồn gen lợn Ỉ cũng như đa dạng sinh học của giống lợn quý này. Mặc dù đã có công trình về tạo phôi lợn Ỉ nhân bản từ nguyên bào trứng đã loại bỏ ZP [8], nhưng chưa có công trình nào so sánh hiệu quả của việc loại bỏ hoặc không loại bỏ ZP trong quá trình tạo phôi lợn Ỉ nhân bản tại Việt Nam. Mục đích của nghiên cứu này là đánh giá ảnh hưởng của việc loại bỏ ZP đến hiệu quả tạo phôi lợn Ỉ nhân bản.

Vật liệu, phương pháp nghiên cứu

Vật liệu

Các hóa chất sử dụng trong nghiên cứu này được cung cấp bởi Hãng Sigma - Aldrich (Hóa Kỳ).

Chuẩn bị nguyên bào sợi lợn Ỉ

Nguyên bào sợi lợn Ỉ được thu từ mô tai lợn Ỉ thuần nuôi

* Tác giả liên hệ: Email: pddlanvn@yahoo.com

Effect of zona pellucida removal on the development of I cloned pig embryos

Khanh Van Nguyen, Xuan Huu Quan,
Thị Hương Nguyễn, Thị Thu Hương Vũ, Thị Âu Hoàng,
Thị Kim Yến Phạm, Doan Lan Phạm*

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

Received 1 July 2020; accepted 10 August 2020

Abstract:

This study aims to evaluate the effect of zona pellucida (ZP) removal on the efficiency of cloned embryos of I pig. For producing I pig cloned embryos, the authors used the oocytes with ZP and with ZP removal. The results showed that the percentage of intact oocytes after enucleation of the group with ZP removal oocytes was 96.19 and 86.28% and of the group with ZP was 83.92 and 82.19%. However, the rates of intact enucleated oocytes among these groups have no statistical significance (86.28 to 82.19% with $p > 0.05$). Enucleated oocytes were implanting somatic cell nuclear transfer, fused, activated by cytochalasin B (7.5 $\mu\text{g/ml}$), and *in vitro* cultured in PZM3 medium to evaluate the efficiency of embryogenesis. The cleavage rate and blastocyst formation of the group with ZP removal were higher than those of the group with ZP, 84.98 vs 71.84% and 24.41 vs 16.03% respectively ($p < 0.05$). The results exhibited that ZP removal improved the efficiency of producing cloned embryos of native I pig of Vietnam.

Keywords: I pig cloned embryos with zona pellucida, I pig cloned embryos with zona pellucida removal, somatic cell nuclear transfer, zona pellucida.

Classification number: 4.6

tại Trung tâm Lợn giống Dabaco (Bắc Ninh). Các mẫu mô tai lợn I được loại bỏ hết lông, mỡ thừa và cắt thành các mảnh nhỏ có diện tích khoảng 1 mm^2 và nuôi trong môi trường nuôi nguyên bào sợi DMEM có bổ sung 10% huyết thanh thai bê và kháng sinh ở điều kiện 37°C, 5% CO_2 , độ ẩm không khí bão hòa. 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 nguyên bào sợi 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 SCNT. Các nguyên bào sợi đạt tới trạng thái cấy chuyển được đồng pha chu trình tế bào về giai đoạn G0/G1 trước khi SCNT. Quá trình đồng pha được thực hiện như sau: các nguyên bào sợi được nuôi trong môi trường DMEM có bổ sung 0,5% huyết thanh thai bê trong vòng 48h ở điều kiện 37°C, 5% CO_2 , độ ẩm không khí bão hòa. Sau 48h các tế bào sẽ được thu và sử dụng cho quá trình cấy chuyển SCNT.

Nuôi thành thực *in vitro* tế bào trứng lợn

Buồng trứng lợn đủ tiêu chuẩn sử dụng cho thí nghiệm được thu từ lò mổ, bảo quản trong dung dịch PBS có bổ sung kháng sinh và vận chuyển về phòng thí nghiệm ở 30-35°C trong vòng 2-3h. Sử dụng phương pháp chọc hút để thu tế bào trứng lợn từ những nang trứng có đường kính 3-6 mm 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, eCG, hCG và dbcAMP (50 tế bào trứng/giếng) trong vòng 20-22h ở điều kiện 38,5°C, 5% CO_2 , độ ẩm không khí bão hòa. Sau 20-22h, tế bào trứng được chuyển sang nuôi trong môi trường POM2 có bổ sung EGF, eCG và hCG trong vòng 20-22h ở điều kiện 38,5°C, 5% CO_2 , độ ẩm không khí bão hòa.

Loại nhân tế bào trứng lợn

Sau 40-44h 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 cumulus. Lựa chọn các tế bào trứng lợn thành thực *in vitro* dựa vào sự xuất hiện của thể cực thứ nhất. Các tế bào trứng thành thực là các tế bào trứng có sự xuất hiện của thể cực thứ nhất. Chỉ sử dụng các tế bào trứng thành thực cho quá trình loại nhân. Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng hai phương pháp loại nhân khác nhau.

Loại nhân tế bào trứng lợn không có ZP: quá trình loại nhân được thực hiện theo phương pháp của Hosseini và cs (2013) [9] có cải biến. Tế bào trứng lợn thành thực *in vitro* trước khi loại nhân sẽ được loại bỏ ZP và xử lý với Demecolcine. Quá trình loại bỏ ZP được thực hiện như sau: tế bào trứng lợn thành thực *in vitro* được chuyển sang môi trường loại bỏ ZP có chứa 1,5 $\mu\text{g/ml}$ Pronase trong vòng

3-6 phút. Sau loại bỏ ZP, tế bào trứng được chuyển sang môi trường TALP-HEPES + 10% huyết thanh thai bê. Tế bào trứng lợn đã được loại bỏ ZP 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 giúp cho các kỹ thuật viên 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 0,5 $\mu\text{g/ml}$ 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 pipet dưới kính hiển vi soi nổi có độ phóng đại 100 lần.

Loại nhân tế bào trứng lợn có màng ZP: để loại nhân tế bào trứng có ZP cần phải sử dụng bộ micro pipet (pipet giữ và pipet tiêm) cùng với hệ thống máy Piezo. Tế bào trứng lợn với thể cực thứ nhất được chuyển vào môi trường loại nhân có chứa 0,5 $\mu\text{g/ml}$ Cytochalasin B. Tế bào trứng được cố định bằng một pipet giữ sao cho thể cực ở vị trí 3h. Dịch chuyển pipet tiêm tiếp xúc với ZP ở vị trí có thể cực, sau đó sử dụng máy Piezo để khoan thủng ZP tại vị trí đó. Tiếp theo, nhẹ nhàng đưa pipet tiêm xuyên vào bên trong tế bào trứng, hút phần tế bào trứng có chứa thể cực thứ nhất (lượng tế bào chất phải <30% thể tích tế bào trứng) vào bên trong pipet tiêm. Sau đó nhẹ nhàng rút pipet tiêm ra ngoài tế bào trứng và đẩy phần tế bào chất ra khỏi pipet tiêm. Các tế bào trứng sau loại nhân sẽ được chuyển vào môi trường giữ tế bào trứng để sử dụng cho quá trình cấy chuyển SCNT.

Cấy chuyển SCNT và dung hợp

Tế bào chất nhận không có ZP: tế bào trứng sau loại nhân được chuyển vào dung dịch chứa 1 mg/ml Phytohemagglutinin (PHA) trong 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. Các cặp tế bào trứng nhận - tế bào cho được chuyển sang dung dịch dung hợp trong vòng 2-3 phút cho đến khi 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 30 μs .

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% CO_2 , 5% O_2 và độ ẩm không khí bão hòa. Sau 2h 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.

Tế bào chất nhận có ZP: quá trình cấy chuyển nhân tế bào cho vào tế bào trứng nhận có ZP được thực hiện như sau: tìm lại vị trí đã được khoan thủng trên ZP của tế bào trứng đã loại nhân, cố định tế bào trứng bằng pipet giữ, sử dụng pipet tiêm để hút một tế bào cho vào bên trong, nhẹ nhàng đưa pipet tiêm có chứa tế bào trứng vào bên trong tế bào trứng thông qua vị trí đã loại nhân trước đó và đẩy tế bào cho vào bên trong giữa tế bào trứng, nhẹ nhàng rút pipet tiêm ra khỏi tế bào trứng.

Hoạt hóa tế bào trứng sau cấy chuyển nhân tế bào cho và nuôi phôi in vitro

Tế bào trứng không có ZP sau cấy chuyển nhân: tại thời điểm 2h 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 môi trường hoạt hóa PZM3 có bổ sung 7,5 $\mu\text{g/ml}$ CyB trong vòng 3h ở điều kiện 38,5°C, 5% CO_2 , 5% O_2 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% CO_2 , 5% O_2 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 7 sau hoạt hóa.

Tế bào trứng có ZP sau cấy chuyển nhân: tế bào trứng nhận có ZP sau khi được cấy chuyển nhân tế bào cho sẽ được xung điện ở 1,5 kV/cm trong thời gian 100 μs . Tiếp theo, các cặp tế bào cho - tế bào trứng nhận được chuyển sang môi trường hoạt hóa PZM3 có bổ sung 7,5 $\mu\text{g/ml}$ CyB trong vòng 3h ở điều kiện 38,5°C, 5% CO_2 , 5% O_2 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 môi trường PZM3 ở điều kiện 38,5°C, 5% CO_2 , 5% O_2 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 7 sau hoạt hóa.

Phương pháp nhuộm Hoechst 33342

Quá trình nhuộm tế bào trứng/phôi được thực hiện như sau:

Chuẩn bị ba loại môi trường: (1) Hoechst 33342 stock: 250 μg Hoechst 33342/ml Ethanol tuyệt đối; (2) Dung dịch nhuộm tế bào trứng/phôi: 50 μl Hoechst 33342 stock + 450 μl Ethanol tuyệt đối; (3) Dung dịch rửa tế bào trứng/phôi: PBS + 0,3% PVP.

Rửa tế bào trứng/phôi trong dung dịch PBS có bổ sung 0,3% PVP; tiếp theo chuyển tế bào trứng/phôi vào dung

dịch nhuộm tế bào trứng/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 tế bào trứng/phôi sau khi đã cố định trong dung dịch nhuộm tế bào trứng/phôi vào giếng 1 để rửa phôi, sau đó chuyển tế bào trứng/phôi sang giếng 2 và rửa tế bào trứng/phôi trong dung dịch Glycerol. Sau khi tế bào trứng/phôi được rửa trong Glycerol, chuyển sang lam kính, mỗi tế bào trứng/phôi một giọt và xếp hàng dọc theo chiều dọc lam kính. Đặt lam 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 việc loại bỏ ZP đến hiệu quả loại nhân tế bào trứng

Ảnh hưởng của việc loại bỏ ZP đến hiệu quả loại nhân tế bào trứng được đánh giá dựa trên tỷ lệ tế bào trứng nguyên vẹn và không có nhân sau loại nhân. Các tế bào trứng sau loại nhân được nhuộm với Hoechst 33342 để kiểm tra hiệu quả loại nhân. Tế bào trứng được loại nhân thành công là tế bào trứng nguyên vẹn và không còn nhân sau loại nhân. Kết quả được thể hiện ở bảng 1.

Bảng 1. Hiệu quả loại nhân tế bào trứng có và không có ZP.

Dạng tế bào trứng	Tế bào trứng được loại nhân (n)	Tế bào trứng nguyên vẹn sau loại nhân n, %(Mean±SE)	Tế bào trứng nguyên vẹn và không còn nhân sau loại nhân n, %(Mean±SE)
Có ZP	462	386 83,92±1,32 ^a	316 82,19±1,42 ^a
Không có ZP	504	484 96,19±0,62 ^b	416 86,28±1,96 ^a

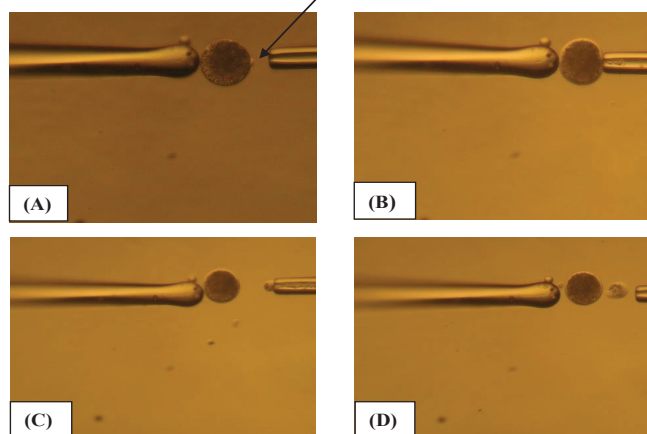
Ghi chú: các giá trị trong cùng một cột có chữ cái khác nhau là sai khác có ý nghĩa ($p < 0,05$).

Kết quả nghiên cứu cho thấy, tỷ lệ tế bào trứng nguyên vẹn sau loại nhân của nhóm đã loại bỏ ZP (96,19%) cao hơn có ý nghĩa so với nhóm có ZP (83,92%), mặc dù tỷ lệ tế bào trứng nguyên vẹn và không còn nhân sau loại nhân của nhóm đã loại bỏ ZP (86,28%) cao hơn nhóm có ZP (82,19%) không có ý nghĩa.

Trong nghiên cứu này, chúng tôi sử dụng hệ thống máy Piezo cùng với một pipet giữ và một pipet vi thao tác để loại nhân tế bào trứng có ZP, mặc dù hệ thống Piezo được thiết kế để làm giảm thiểu những tổn thương đối với tế bào trứng trong quá trình loại nhân, nhưng để loại bỏ được nhân tế bào trứng trong quá trình loại nhân tế bào trứng có ZP thì một

lượng lớn tế bào chất sẽ bị loại bỏ cùng với thể cực (20-30% thể tích tế bào trứng) (hình 1). Đây cũng là một trong những nguyên nhân làm tổn thương màng tế bào chất của tế bào trứng, gây nên hiện tượng tế bào trứng bị tan rã ngay trong quá trình loại nhân tế bào trứng có ZP [10].

Phần tế bào chất lồi ra sau xử lý với Demecolcine có chứa nhân



Hình 1. Quá trình loại nhân tế bào trứng lợn không có ZP. (A) Tế bào trứng lợn với phần nhân lồi ra sau xử lý với Demecolcine; **(B)** Hút bỏ phần tế bào chất lồi ra có chứa nhân; **(C)** Tế bào chất có chứa nhân đã được hút bỏ; **(D)** Tế bào trứng sau loại nhân.

Việc loại bỏ ZP trước khi loại nhân tế bào trứng làm cho quá trình loại nhân trở nên đơn giản, dễ dàng, giúp tế bào trứng tránh khỏi những tổn thương trong quá trình loại nhân. Tế bào trứng sau khi được loại bỏ ZP sẽ được xử lý với Demecolcine trước khi tiến hành quá trình loại nhân. Demecolcine là chất hóa học có tác dụng đẩy phần nhân tế bào trứng ra sát với ngoại vi tế bào trứng, tạo thành một khối hình nón (hình 2), qua đó giúp cho kỹ thuật viên dễ dàng nhận biết được phần tế bào chất có chứa nhân và lượng thể tích tế bào chất bị loại bỏ trong quá trình loại nhân sẽ giảm đi đáng kể (3-5% thể tích tế bào trứng), 95-97% lượng thể tích tế bào chất được giữ lại sau loại nhân và không bị tan rã [7].

Phần tế bào chất bị loại có chứa nhân tế bào trứng



Hình 2. Loại nhân tế bào trứng lợn có ZP.

Ảnh hưởng của việc loại bỏ ZP đến hiệu quả tạo phôi lợn Ỉ nhân bản

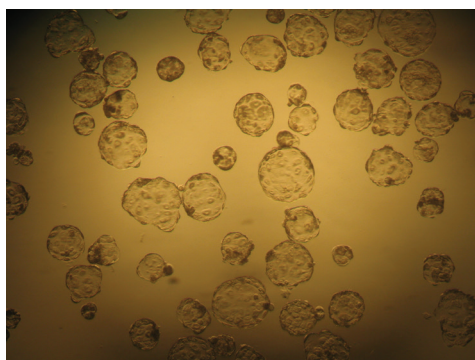
Trong nghiên cứu này, ảnh hưởng của việc loại bỏ ZP đến hiệu quả tạo phôi lợn Ỉ nhân bản được đánh giá dựa trên tỷ lệ tế bào trứng phân chia, tạo phôi nang sau cấy chuyển SCNT. Kết quả được thể hiện ở bảng 2.

Bảng 2. Ảnh hưởng của việc loại bỏ ZP đến hiệu quả tạo phôi lợn Ỉ nhân bản.

Dạng tế bào trứng	Tế bào trứng sau cấy chuyển nhân	Tế bào trứng phân chia n, %(Mean±SE)	Phôi nang n, %(Mean±SE)	Trung bình tổng số tế bào/phôi nang Mean±SE
Có ZP	301	215 71,84±1,76 ^a	48 16,03±1,56 ^a	41,38±2,01
Không có ZP	288	244 84,98±1,22 ^b	70 24,41±1,82 ^b	44,57±1,88

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

Kết quả ở bảng 2 cho thấy, tỷ lệ tế bào trứng phân chia và tỷ lệ hình thành phôi nang (hình 3) của nhóm đã loại bỏ ZP là cao hơn có ý nghĩa so với nhóm có ZP (hình 4) (84,98 so với 71,84% và 24,41 so với 16,03%, $p < 0,05$). Điều này cho thấy, việc loại bỏ ZP giúp nâng cao được hiệu quả tạo phôi lợn Ỉ nhân bản.



Hình 3. Phôi nang lợn Ỉ nhân bản không có ZP.



Hình 4. Phôi nang lợn Ỉ nhân bản có ZP.

Việc loại bỏ ZP trong quá trình tạo phôi động vật nhân bản đã được các nhà khoa học nghiên cứu. Zhang và cs (2013) [11] báo cáo về việc tạo được cừu chuyển gen có hàm lượng cao acid béo omega-3 trong sữa bằng cách loại bỏ ZP của tế bào trứng nhận trong quá trình loại nhân. Việc loại bỏ ZP có hiệu quả cao so với cấy chuyển SCNT truyền thống (cấy chuyển SCNT vào tế bào trứng nhận có ZP). Tế bào trứng nhận được loại bỏ ZP trước khi loại nhân giúp cho quá trình loại nhân trở nên dễ dàng và nâng cao hiệu quả dung hợp tế bào chất tế bào trứng nhận với tế bào soma [3]. Trong cùng một thời gian, số lượng tế bào trứng được loại nhân bằng phương pháp không ZP nhiều hơn 2-3 lần so với phương pháp loại nhân thông thường (phương pháp loại nhân có ZP) [5].

Để tạo các phôi tái cấu trúc, một nhân đã được phân lập hoặc tế bào soma sẽ được cho vào trong tế bào chất bằng vi tiêm hoặc xung điện. Đối với tế bào trứng có ZP, tế bào cho sẽ được chuyển vào trong tế bào chất bằng kỹ thuật vi tiêm. Việc tác động cơ học nhiều lần đến màng tế bào chất của tế bào trứng sẽ làm gia tăng tỷ lệ tổn thương màng tế bào chất, ảnh hưởng đến khả năng phát triển tiếp theo của tế bào trứng có ZP sau cấy chuyển SCNT.

Ngược lại, đối với tế bào trứng không có ZP, cấu trúc tế bào chất - tế bào soma thường được tạo ra dưới kính hiển vi soi nổi thông thường trong dung dịch Phytohemagglutinin. Quá trình cấy chuyển SCNT vào bên trong tế bào trứng không có ZP được thực hiện thông qua quá trình xung điện. Điều này đảm bảo cho sự nguyên vẹn của màng tế bào chất trong quá trình cấy chuyển SCNT. Sự nguyên vẹn của màng tế bào chất tế bào trứng là một trong các điều kiện quan trọng nhất đảm bảo cho sự thành công của quá trình xung điện cấy chuyển nhân tế bào cho và khả năng phát triển tiếp theo của phôi tái cấu trúc sau cấy chuyển nhân tế bào cho.

Khi SCNT được chuyển vào bên trong tế bào chất của tế bào trứng nhận, một số protein có trong nhân tế bào cho được giải phóng vào bên trong tế bào chất tế bào trứng nhận và ngược lại một số protein khác có trong tế bào chất tế bào trứng nhận được thu nhận bởi nhân tế bào cho. Nếu một lượng lớn thể tích tế bào chất bị loại bỏ đi trong quá trình loại nhân sẽ làm mất đi một lượng protein có trong tế bào chất, đó có thể là một trong những nguyên nhân làm giảm tỷ lệ phôi nang được hình thành sau cấy chuyển nhân vào tế bào trứng có ZP đã được loại nhân [12]. Trong quá trình loại nhân tế bào trứng không có ZP, lượng thể tích tế bào chất có chứa nhân tế bào trứng được loại bỏ thường ít hơn 4% thể tích tế bào trứng, qua đó tăng số lượng tế bào trứng được tái cấu trúc sau cấy chuyển nhân, nâng cao hiệu quả tạo phôi nhân bản [13].

Quá trình tái lập trình nhân tế bào cho có chứa trong phôi tái cấu trúc có liên quan đến hiệu quả dung hợp tế bào

chất tế bào trứng nhận với nhân tế bào cho. Tế bào trứng thành thực *in vitro* đã được loại nhân là nguồn nguyên liệu được sử dụng như là tế bào chất nhận. Tế bào chất của tế bào trứng ở giai đoạn MII có chứa các nhân tố điều khiển quá trình tái lập trình nhân tế bào cho sau cấy chuyển [14]. Đối với tế bào trứng không có ZP, do lượng thể tích tế bào chất bị loại trong quá trình loại nhân ít (3-5%) nên tế bào chất của tế bào trứng nhận giữ lại được hầu hết các nhân tố điều khiển quá trình tái lập trình nhân tế bào cho, qua đó nâng cao hiệu quả tạo phôi sau cấy chuyển SCNT. Ở lợn, nếu lượng thể tích tế bào chất bị loại bỏ trong quá trình loại nhân chiếm 20-30% thể tích tế bào trứng thì chỉ có khoảng 42-60% tế bào trứng sau cấy chuyển nhân hoàn thành được quá trình tái cấu trúc của mình; đây cũng là một trong những nguyên nhân làm giảm hiệu quả tạo phôi lợn nhân bản [15].

Kết luận

Loại bỏ ZP nâng cao hiệu quả tạo phôi lợn Ỉ nhân bản bằng kỹ thuật cấy chuyển nhân (SCNT); tỷ lệ tạo phôi nang lợn Ỉ nhân bản với tế bào trứng đã loại bỏ ZP đạt 24,41%; nhân bản với tế bào trứng đã loại bỏ ZP đơn giản, dễ sử dụng, nhanh chóng và hiệu quả hơn so với tế bào trứng có ZP.

Đề nghị tiếp tục nghiên cứu và sử dụng phôi lợn Ỉ nhân bản làm nguồn phôi nguyên liệu dùng cho quá trình cấy chuyển phôi tạo lợn Ỉ nhân bản.

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 SCNT” 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 Phát triển nông thôn. Các tác giả xin trân trọng cảm ơn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] I.A. Polejaeva, et al. (2000), “Cloned pigs produced by nuclear transfer from adult somatic cell”, *Nature*, **407**, pp.86-90.
- [2] P.J. Booth, et al. (2001a), “Simplification of bovine somatic cell nuclear transfer by application of a zona free manipulation technique”, *Cloning Stem Cell*, **3**, pp.139-150.
- [3] C. Galli, et al. (2003), “A cloned horse born to its dam twin”, *Nature*, **424**, p.635.

- [4] P.J. Booth, et al. (2001b), “Application of the zona free manipulation technique to porcine somatic nuclear transfer”, *Cloning Stem Cell*, **3**, pp.191-197.
- [5] I. Lagutina, et al. (2007), “Comparative aspects of somatic cell nuclear transfer with conventional and zona - free method in cattle, horse, pig and sheep”, *Theriogenology*, **67**, pp.90-98.
- [6] M.I. Prokofiev, et al. (2007), “Blind enucleation of oocytes is highly efficient in zona-free bovine cloning”, *Reprod. Fertil. Dev.*, **19**, pp.156-157.
- [7] G.P. Malenko, et al. (2015), “Perspective of zona-free method use in farm animal cloning”, *Agricultural Biology*, **50(4)**, pp.420-430.
- [8] Nguyễn Khánh Vân, Quàn Xuân Hữu, Vũ Thị Thu Hương, Phạm Doãn Lâm (2020), “Ảnh hưởng của Dimethylaminopurine, Cytochalasin B, Cycloheximide đến khả năng phát triển *in vitro* của phôi lợn Ỉ nhân bản không màng sáng”. *Tạp chí Công nghệ sinh học*, **18(1)**, tr.1-9.
- [9] S.M. Hosseini, et al. (2013), “Simple, fast, and efficient method of manual oocyte enucleation using a pulled Pasteur pipette”, *In vitro Cell Dev. Biol. Anim.*, **49(8)**, pp.569-575, DOI: 10.1007/s11626-013-9630-4.
- [10] T. Dominko, et al. (2000), “Dynamic imaging of the metaphase II spindle and material chromosomes in bovine oocytes implications for enucleation efficiency verification, avoidance of parthenogenesis and successful embryogenesis”, *Biology of Reproduction*, **62**, pp.150-154.
- [11] P. Zhang, et al. (2013), “Handmade cloned transgenic sheep rich in omega-3 fatty acids”, *PLOS ONE*, **8(2)**, p.e55941.
- [12] K.M. Whitworth, R.S Prather (2010), “Somatic cell nuclear transfer efficiency: how can it be improved through nuclear remodeling and reprogramming”, *Mol. Reprod. Dev.*, **77**, pp.1001-1015.
- [13] B. Oback, et al. (2003), “Cloned cattle derived from a novel zona-free embryos reconstruction system”, *Cloning Stem Cells*, **5**, pp.3-12.
- [14] I. Wilmut, et al. (1997), “Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells”, *Nature*, **385**, pp.810-813.
- [15] B.G. Jeon, et al. (2011), “*In vitro* developmental potential of nuclear transfer embryos cloned with enucleation methods using pre-denuded bovine oocytes”, *Reprod. Dom. Anim.*, **46**, pp.1035-1042.