

NUÔI CÂY VÀ NGHIÊN CỨU KHẢ NĂNG TẠO CHUỘT KHẢM CỦA TẾ BÀO GỐC PHÔI CHUỘT DÒNG C57BL/6

CULTURE AND STUDY OF THE ABILITY TO PRODUCE CHIMERIC MICE OF
STRAIN C57BL/6 MOUSE EMBRYONIC STEM CELL

TRẦN CẨM TÚ^(*) và TRẦN THỊ MINH^(**)

TÓM TẮT: Dòng tế bào gốc phôi chuột C57BL/6 đã được thiết lập và sử dụng rất rộng rãi trong các thí nghiệm sinh học. Mặt khác, thể khảm là một công cụ đắc lực dùng để nghiên cứu các vấn đề của sinh học phát triển và ngày càng quan trọng hơn cùng với những thành tựu nổi bật của tế bào gốc. Vì thế việc sử dụng dòng tế bào gốc phôi C57BL/6 cho các nghiên cứu về tế bào học là rất cần thiết và tránh các vấn đề đạo đức cũng như bước đầu đặt nền tảng nghiên cứu tế bào gốc phôi người. Nghiên cứu này trình bày các kết quả nuôi cấy tế bào gốc phôi dòng C57BL/6 trong môi trường huyết thanh KSR 15% (Knockout Serum Replacement) thay thế nguồn huyết thanh cổ điển. Bài viết còn trình bày về khả năng tạo khảm của dòng tế bào gốc phôi chuột C57BL/6 vào phôi chuột nhắt trắng *Mus musculus* var. albino. Kết quả bước đầu cho thấy tế bào gốc dòng C57BL/6 tăng sinh không biệt hóa mạnh trong môi trường sử dụng KSR và nồng độ LIF ngoại sinh là 10^3 IU/mL và bằng kỹ thuật vi tiêm mES vào phôi chuột *Mus musculus* var. albino đã tạo thành công con khảm.

Từ khóa: C57BL/6; tế bào gốc phôi chuột; dung hợp phôi; vi tiêm tế bào gốc; thể khảm.

ABSTRACTS: Strain C57BL/6 mouse embryonic stem cell has been created and widely used in a variety of biological experiments. On the other hand, chimera is a powerful tool for study of developmental biology and becomes more important with ES achievements. Therefore, the use of C57BL/6 embryonic stem cell for cytological studies is essential and avoids the ethical issues as well as puts the initial foundation for the study of human embryonic stem cells. The study presents the results of culturing mES strain C57BL/6 in mES medium plus 15% KRS (Knockout Serum Replacement) instead of traditional FBS. Moreover, we also checked The study also presents the ability to form chimeric mouse between mES C57BL/6 strain and embryo of *Mus musculus* var. albino mice. The preliminary results showed that the strain C57BL/6 mouse embryonic stem cell has not strongly differentiated in the environment with KRS and exogenous LIF at concentration of 103IU/ml and chimeras were produced successfully by injecting mES in embryo of *Mus musculus* var. albino mice.

Key words: C57BL/6; mouse embryonic stem cells; embryo aggregation; mes injection; chimera.

(*) TS. Viện Sinh học nhiệt đới, camtu79@gmail.com, Mã số: TCKH11-03-2018

(**) ThS. Trường Đại học Văn Lang, tranthiminh@vanlanguni.edu.vn

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Tế bào gốc phôi có những tiềm năng to lớn, là một nguồn cung cấp nhiều loại tế bào khác nhau cho nghiên cứu về liệu pháp tế bào (Cell Therapy), khám phá thuốc và tầm soát độc học [8]. Bên cạnh đó, vấn đề tạo động vật thể khảm là minh chứng tốt nhất cho tính toàn năng của tế bào gốc phôi [3]. Phôi khảm lần đầu tiên được tạo ra bằng cách tiêm các tế bào khối u vào túi phôi [4, tr.151-156]. Các tế bào EC (Embryonal Carcinoma Cell) đã tham gia tạo nhiều mô khác nhau và con khảm mang nhiều khối u. Tiếp theo là những nghiên cứu tạo con khảm bình thường từ tế bào nút phôi [4, tr.151-156]. Vào năm 1984, Evans và Kaufman đã xác định được con khảm dòng sinh dục từ tế bào E-K, từ đó nêu lên khả năng truyền các biến đổi gene qua dòng sinh dục các con khảm. Đến năm 1986, Evans đã báo cáo về việc sử dụng các virus phiên mã ngược để biến đổi gene các tế bào ES, điều này chứng minh tế bào gốc phôi là một phương tiện hữu hiệu trong việc tạo nên các động vật chuyển gene. Tháng 12-1986, họ đã tạo thành công chuột có gene chống chịu neomycin, bằng việc sử dụng virus phiên mã ngược truyền qua tế bào gốc phôi [4, tr.151-156].

Với kỹ thuật vi tiêm tế bào gốc vào phôi, có nhiều loại thể khảm đã được tạo ra, ở chuột, gà, dê,... Trong quá trình đó, tế bào gốc thường tham gia tạo các tế bào sinh dưỡng khác nhau của cơ thể. Có một tỷ lệ nhất định tế bào gốc là tế bào mầm sinh dục, chúng di cư vào tuyến sinh dục và tham gia tạo giao tử cùng các tế bào sinh dục của cơ thể chủ [1, tr.22-29].

Dòng chuột C57Bl/6 là dòng phổ biến nhất khi nghiên cứu các vấn đề về động vật chuyển gene [2, tr.76-81]. Ngoài ra, dòng chuột này đã được thiết lập thành dòng tế bào gốc phôi và sử dụng rộng rãi trong các thí nghiệm sinh học. Môi trường để thiết lập dòng tế bào gốc phôi đặc biệt quan trọng. Hiện nay, môi trường sử dụng loại huyết thanh thay thế (KSR) thực sự hỗ trợ tế bào gốc phôi chuột phát triển tốt hơn huyết thanh cổ điển (FBS) [9]. Mặt khác, thể khảm còn là một công cụ đắc lực dùng để nghiên cứu các vấn đề của sinh học phát triển và ngày càng quan trọng hơn cùng với những thành tựu nổi bật của tế bào gốc. Vì thế, việc sử dụng tế bào gốc phôi từ dòng chuột C57Bl/6 cho các nghiên cứu về tế bào học là rất cần thiết và tránh các vấn đề đạo đức cũng như bước đầu đặt nền tảng nghiên cứu tế bào gốc phôi người [5, tr.917-918].

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1. Thu nhận MEF (Mouse Embryonic Fibroblast) làm lớp giá thể nuôi mESCs

Thu MEF từ phôi thai chuột 12,5-13,5 ngày tuổi. Phôi được loại sạch máu, nội quan, tứ chi và rửa bằng PBS (Gibco). Cắt nhuyễn, ủ trong 2ml dung dịch trypsin EDTA 0,25% (Gibco) trong 2 phút. Huyền phù tế bào với 2ml DMEM 10% FBS (Gibco). Ly tâm ở 1500 vòng/phút, 4°C, 5 phút, thu tủa tế bào. Tái huyền phù bằng môi trường DMEM bổ sung 10% FBS và 1% kháng sinh nuôi trong tủ ấm 37°C và 5%CO₂, thay môi trường sau 24h. Tiến hành cấy chuyển khi mật độ tế bào đạt hơn 95% bề mặt nuôi cấy.

Bắt hoạt phân bào mEF bằng Mitomycin C nồng độ 10µg/mL (Sigma) trong 2,5 giờ ở 37°C, 5% CO₂ trước khi sử dụng làm giá thể nuôi tế bào gốc phôi chuột (mES).

2.2. Nuôi cấy tế bào gốc phôi chuột dòng C57Bl/6

Tế bào gốc phôi dòng C57Bl/6 p11 (Milipore) được nuôi trong môi trường knockout DMEM (Gibco), 15%KSR (Gibco), 1% Streptomycin (Gibco), 200Mm L-Glutamine (Sigma), 1% Non-essential amino acid (Gibco), LIF 10^3 IU/ml (Gibco), 0,1Mm β -Mercaptoethanol (Sigma). Nuôi cấy ở 37°C , 5% CO_2 , thay môi trường mES sau 24h. Tiến hành cấy chuyển tế bào sau khi đạt mật độ từ 65-70% bề mặt nuôi cấy nhằm tránh sự dính các quần thể (Colonies) tế bào lại với nhau.

Phương pháp cấy chuyển mES: Bỏ môi trường cũ và tráng lại 2 lần bằng PBS (Gibco); bổ sung trypsin/EDTA 0,25% vào bình nuôi (bình Roux, 25cm^2), ủ ấm trong tủ CO_2 từ 1-2 phút. Sau đó, bổ sung 5mL môi trường nuôi ES không LIF. Ly tâm ở 1500v/phút, 4°C , 5 phút để thu tủa tế bào. Tái huyền phù tủa tế bào bằng môi trường ES có bổ sung LIF nồng độ 10^3 IU/ml và chuyển vào bình nuôi mới. Thay môi trường sau 24h.

2.3. Thu phôi *in vivo* và nuôi phôi *in vitro*

Chuột nhất trắng cái từ 6-8 tuần tuổi, khỏe mạnh, trọng lượng khoảng 28-32g (Viện Pasteur) được gây siêu rụng trứng bằng hormone. Tiêm 10IU hormone PMSG (Sigma) vào giữa chu kỳ sang sau đó 48h tiêm 10IU hCG (Sigma) vào xoang bụng. Tiến hành cho phối tự nhiên với chuột đực khỏe mạnh, trọng lượng 28-32g.

Thu phôi giai đoạn 2 tế bào sau khi phối một ngày từ ống dẫn trứng trong môi trường Hepes (Gibco) và chuyển phôi vào các vi giọt chứa môi trường KSOM

(Milipore), nuôi phôi *in vitro* đến giai đoạn blastocyst ở tủ ấm 37°C , 5% CO_2 .

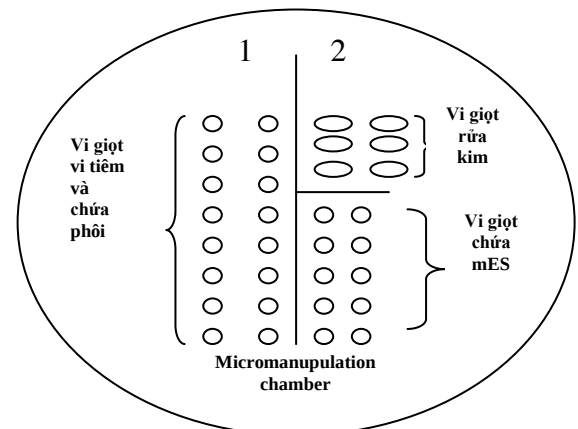
2.4. Kỹ thuật vi tiêm

2.4.1. Tạo kim

Tạo kim vi tiêm và kim giữ phôi từ mao quản thủy tinh (Drummond) bằng máy kéo Narishige. Kim vi tiêm được mài nhọn và uốn với đường kính $25\mu\text{m}$, chiều dài đầu nhọn $55\mu\text{m}$ và góc uốn 35° . Kim giữ phôi có đường kính trong $20\mu\text{m}$, đường kính ngoài $100\mu\text{m}$, góc uốn cong 35° .

2.4.2. Chuẩn bị đĩa vi tiêm

Đĩa nhựa vô trùng đường kính 35mm (Falcon). Tạo vi giọt vi tiêm, $10\mu\text{l}$ /giọt và vi giọt chứa phôi, $15\text{-}20\mu\text{l}$ /giọt (Hình 1). Sau đó, phủ dầu khoáng (Sigma) ngập các giọt.



Hình 1. Tạo đĩa vi tiêm

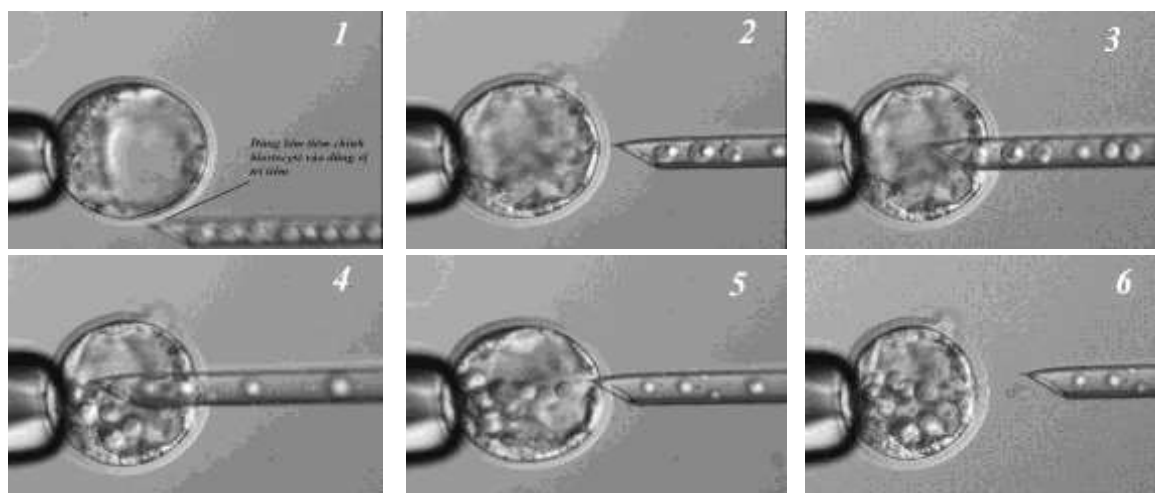
2.4.3. Chỉnh kim

Lắp, chỉnh kim vào vị trí trung gian, điều chỉnh mặt nghiêng của kim song song với mặt phẳng của bề ổn nhiệt của kính. Nâng đồng thời 2 kim lên và đặt đĩa vi tiêm lên bề kính. Chỉnh áp lực kim vi tiêm bằng cách kéo kim ra khỏi giọt môi trường tạo mao dẫn để dầu khoáng di chuyển vào kim, đưa lại kim vào giọt môi trường để môi trường tự di chuyển vào kim đến khi dừng.

2.4.4. Tiến hành vi tiêm

Di chuyển kim giữ phôi ở vị trí 9h (khối ICM ở vị trí 9h) và phía đối diện 3h để vi tiêm. Điều chỉnh áp lực cho kim giữ hút blastocyst cố định. Di chuyển kim vi tiêm qua vi giọt mES, sử dụng vật kính phóng đại X100, hút từ 15-20 tế bào vào

kim, di chuyển lại vi giọt chứa phôi, đâm kim ở vị trí 3h vào giữa hai tế bào tropoblast, điều chỉnh áp lực thật nhẹ để mES di chuyển từ từ ra khỏi kim, rút từ từ kim tiêm ra (Hình 2). Điều chỉnh kim giữ để thả phôi ra.



Hình 2. Hình ảnh quá trình vi tiêm mES vào blastocyst (X100)

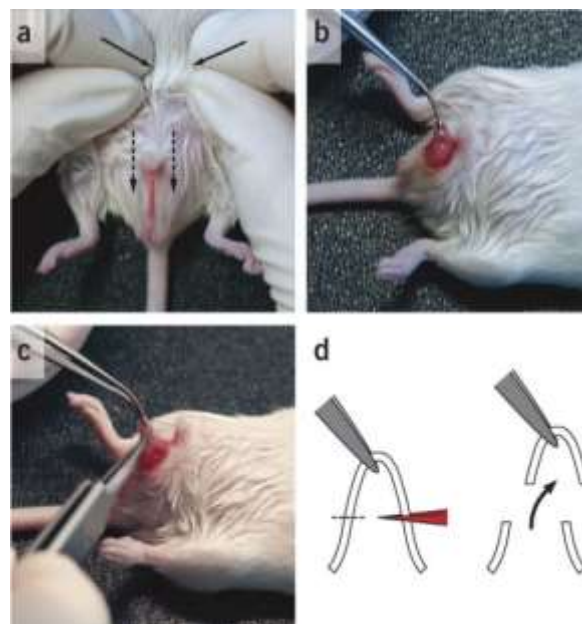
Ghi chú: 1-Có thể điều chỉnh xoay vị trí blastocyst bằng kim tiêm; 2-Tìm vị trí tiêm thích hợp; 3-Đâm kim tiêm vào khoang phôi; 4- Bơm mES vào blastocyst; 5-Điều chỉnh áp lực khoang phôi trước khi rút kim tiêm ra; 6-Hoàn tất quá trình tiêm.

Chuyển phôi qua giọt môi trường KSOM mới, để trong tủ ấm 37°C , $5\%\text{CO}_2$ trong vòng 4-6h rồi tiến hành chuyển phôi.

2.5. Tạo chuột cái mang thai hộ

Trước tiên cần tạo chuột đực bất thụ. Gây mê chuột bằng ketamil (Hà Lan), tiến hành giải phẫu ổ bụng và cắt hai ống dẫn tinh của chuột đực khỏe mạnh trọng lượng 28-35g. Sau đó kiểm tra sự bất thụ bằng cách phối ghép với chuột cái 2 tuần trước khi sử dụng cho con cái nhận phôi (Hình 3).

Con cái nhận phôi được gây đồng pha bằng liệu pháp hormone. Tiêm 10IU PMSG và 10IU hCG cách nhau 48h. Cho phối với chuột đực cắt ống dẫn tinh, 12h sau kiểm tra nếu thấy nút nhầy âm đạo thì tách ra để làm chuột nhận phôi.



Hình 3. Thí nghiệm cắt ống dẫn tinh chuột

Ghi chú: (a) Xác định vị trí mổ; (b) Tìm ống dẫn tinh; (c-d) Cắt 1 đoạn ống dẫn tinh

2.6. Kỹ thuật chuyển phôi

Gây mê chuột cái nhận phôi ở giai đoạn 2,5 ngày bằng cách tiêm ketamil (Hà Lan) vào xoang bụng, mở ổ bụng chuột tìm vị trí tử cung. Dùng kim tiêm 26G (Việt Nam) đâm một lỗ nhỏ trên tử cung dưới ống dẫn trứng. Sau đó, dùng mouth pipette (pipette hút bằng miệng) đường kính từ 100-120 μ m hút 20 phôi và bơm vào trong hai nhánh tử cung chuột nhận. Khâu vết mổ, sát trùng, chăm sóc và kiểm tra sự phục hồi sau phẫu thuật. Theo dõi quá trình mang thai của chuột chuyển phôi, sau khi chuyển thành công 17-19 ngày chuột đẻ.

2.7. Chỉ thị chuột khảm C57Bl/6 bằng kiểu hình và kỹ thuật PCR

Quan sát hốc mắt chuột con sau khi sinh và màu lông sau 2 tuần để nhận biết đặc điểm kiểu hình chuột khảm. Tách chiết DNA mẫu mô tai chuột trắng, chuột khảm và mẫu tế bào gốc C57Bl/6 bằng Kit tách chiết DNA của hãng Invitrogene (Purelink mini Genome DNA-K1820-01). Thực hiện phản ứng PCR sử dụng PCR master mix (Invitrogene). Primer được sử dụng để chỉ thị tế bào C57BL6 ký hiệu D18Mit145F và D18Mit145R. Với chương trình phản ứng như sau: bước 1: 95°C trong 5 phút; bước: 2 94°C trong 30s, 55°C trong 30s, 72°C trong 30s (lặp lại 40 chu kỳ); bước 3: 72°C trong 7 phút. Giữ ở 4°C. Thời gian phản ứng là 1 giờ 50 phút. Sau đó, điện di bằng gel agarose (Sigma) 2% để đọc kết quả.

3. KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN

3.1. Kết quả nuôi cấy nguyên bào sợi thu từ thai chuột (MEF-Mouse embryonic Fibroblast)

Kết quả nuôi cấy MEF từ thai chuột 12,5-13,5 ngày thể hiện ở Bảng 1.

Bảng 1. Mật độ tế bào ban đầu khi thu MEF từ thai chuột 12,5-13,5 ngày

Số thứ tự	Số chuột bầu 12,5-13,5 ngày	Tổng số thai sử dụng để thu nhận MEF	Số mẫu và Mật độ số tế bào ban đầu
1	1	6	#1: 3x10 ⁵
2	3	12	#2: 3x10 ⁵ #3: 4x10 ⁵ #4: 2,5x10 ⁵
3	2	14	#5: 5x10 ⁵ #6: 8x10 ⁵
4	1	10	#7: 4x10 ⁵
5	3	22	#8: 5x10 ⁵ #9: 3x10 ⁵ #10: 2x10 ⁵
Tổng	10	64	

Nguyên bào sợi được thu từ 64 thai chuột 12,5-13,5 ngày. Chúng tôi tiến hành ghi số mẫu từ #1 đến #10 tương ứng với số chuột. Tế bào nuôi trong cùng điều kiện là môi trường DMEM bổ sung 10% FBS, 1% Penicilin/streptomycin, tủ ấm 5% CO₂, 37°C. Môi trường được thay sau 24h nuôi cấy. Về hình dạng những tế bào bám vào dụng cụ nuôi: rất đa dạng, hình thuôn dài, hình góc cạnh, hình đa giác, hình sao. Sau cấy chuyển, chỉ còn lại tế bào thuôn dài, nhân to hình oval, đặc trưng cho nguyên bào sợi (Hình 4, 5). Khi các mẫu nguyên bào sợi mọc phủ 95% diện tích flask nuôi cấy, chúng tôi tiến hành cấy chuyển đến thế hệ thứ 3. Sau đó, những nguyên bào sợi ở thế hệ thứ 3 được đem xử lý mitomycin C để bất hoạt phân bào.



Hình 4. MEF P1 sau 2 ngày cấy chuyển (X10)



Hình 5. MEF P2 đạt mật độ bão hòa (X10)

3.2. Kết quả nuôi tế bào gốc phôi dòng C57Bl/6 trên lớp MEF đã bất hoạt

Trước khi tiến hành nuôi mES, phải chuẩn bị sẵn đĩa nuôi có lớp nguyên bào sợi đã bất hoạt phân bào bằng mitomycin C ở nồng độ $10\mu\text{g/mL}$ và môi trường ES. LIF chỉ bổ sung vào môi trường trước khi nuôi tế bào nhằm tránh sự mất hoạt tính của LIF.

Trong quá trình nuôi, cấy chuyển tế bào chúng tôi thu được hình ảnh dưới kính hiển vi như sau:



Hình 6. C57Bl/6 ES cell line ở thế hệ thứ 12 sau 24h nuôi. Mật độ feeder cells/flask 25cm^3 là $1,5 \times 10^6$ cells. Mật độ tế bào gốc ban đầu $0,5 \times 10^6$ cells. (X10)



Hình 7. C57Bl/6 ES cell line ở thế hệ thứ 15 sau cấy chuyển 2 ngày. Mật độ feeder cells/flask 25cm^3 là $1,5 \times 10^6$ cells. Mật độ tế bào gốc ban đầu 1×10^6 cells. (X40)

Nhận xét: Tế bào gốc phôi dòng C57Bl/6 là dòng tế bào cần lớp feeder cells. Chúng mọc thành những colonies tròn, hơi gồ. Tăng sinh không biệt hóa rất mạnh.

Môi trường Knockout DMEM và KRS thực sự hỗ trợ tế bào gốc phát triển rất tốt với sự hiện diện LIF ngoại sinh ở nồng độ 10^3IU/mL . Nồng độ LIF cực kỳ quan trọng trong vấn đề thiết lập các dòng tế bào gốc phôi và thay đổi tùy vào sự đa dạng di truyền của mỗi loài [3], [7]. Tuy nhiên, với dòng mES C57Bl/6 thì nồng độ 10^3IU/mL là thích hợp [2 tr.76-81]. Thời gian gần đây, hầu hết các bài báo quốc tế về nuôi cấy tế bào gốc phôi chuột đều sử dụng KSR thay cho FBS cổ điển. FBS cho đến nay vẫn còn nhiều nhân tố chưa xác định rõ ràng và vẫn có thể gây ra ảnh hưởng không mong muốn đến sự nuôi cấy tế bào gốc phôi chuột [3]. Tác giả cũng đã tiến hành so sánh hiệu quả nuôi tế bào gốc trong môi trường chỉ có KRS và hỗn hợp KSR + FBS. Tác giả nhận thấy rằng, trong môi trường nuôi chỉ sử dụng KRS thì mES phát triển tốt hơn [6, tr.14-20].

3.3. Kết quả thu phôi *in vivo* và nuôi phôi *in vitro*

Để thu nhận phôi cho quá trình vi tiêm, chúng tôi tiến hành 5 lô thí nghiệm thu nhận phôi từ chuột cái đã được kích thích siêu rụng trứng bằng hai loại kích dục tố là PMSG và hCG với liều lượng là 10IU, khoảng cách giữa 2 lần liên tiêm kích dục tố là 48h. Sau khi thu phôi giai đoạn 2 tế bào từ ống dẫn trứng của chuột cho phôi, chúng tôi đã tiến hành phân loại trước khi thu nhận phôi để nuôi bằng môi trường KSOM trong tủ ấm 37°C , $5\%\text{CO}_2$. Kết quả thu phôi và nuôi phôi sau khi chọn lọc được trình bày ở Bảng 2.

Bảng 2. Số phôi in vivo thu nhận được

Thí nghiệm	Số chuột thí nghiệm	Tổng số phôi 1 tế bào	Tổng số phôi 2 tế bào	Tổng số phôi 4 tế bào	Tổng số phôi thu được	Số phôi trung bình/ 1 con chuột	Số phôi giai đoạn blastocyst
1	10	0	120	0	120	12,0	110
2	10	0	122	5	127	12,7	120
3	10	0	116	0	116	11,6	114
4	10	0	84	0	84	8,4	84
5	10	0	96	0	96	9,6	90
Tổng	50	0	538	5	543	10,86	

Tổng số phôi thu được là 543 phôi trên 50 chuột cái được gây động dục và cho phối tự nhiên. Số phôi trung bình một con là 10,86/con. Đây là tỷ lệ thấp, giống chuột bạch nuôi tại Việt Nam là giống chuột khá phổ biến ở châu Á được sử dụng trong mục đích chính là mang thai hộ hoặc thu nhận feeder cells [8] không phổ biến đề nghiên cứu về hướng hỗ trợ sinh sản, là một giống chuột khá thấp sản so với các dòng khác ví dụ dòng chuột C57Bl/6 hay 129. Mặt khác, chuột bạch *Mus musculus* var. *albino* đáp ứng khác nhau với PMSG và hCG. Tỷ lệ này cũng giống các thí nghiệm sử dụng chuột nhắt trắng tại bộ môn Sinh lý động vật – Trường Đại học Khoa học tự nhiên Thành phố Hồ Chí Minh [9].

3.4. Kết quả vi tiêm mES dòng C57Bl/6 vào blastocyst chuột nhắt trắng và chuyển phôi

Bảng 3. Hiệu quả quá trình vi tiêm

Thí nghiệm	Số phôi blastocyst vi tiêm	Số phôi blastocyst tiêm thành công	Hiệu quả vi tiêm (%)
1	110	90	81,8
2	120	100	83,3
3	114	100	87,7
4	84	80	95,2
5	90	80	88,9
Tổng	518	450	

Hiệu quả vi tiêm cao nhất ở lô thí nghiệm thứ 4 đạt 95,2%, thấp nhất ở lô đầu tiên đạt 81,8%. Những blastocyst đã tiêm thành công được nuôi tiếp tục 4-6h sau đó tiến hành chuyển vào tử cung con cái mang thai hộ.

Tiến hành chuyển 450 phôi đã vi tiêm cho 23 con chuột mang thai hộ 2,5 ngày, với trung bình 20 phôi vi tiêm/1 chuột mang thai hộ, mỗi nhánh chuyển 10 phôi. Chuột sau khi được chuyển phôi, được nhốt riêng, theo dõi và kiểm tra trọng lượng sau 10 ngày chuyển phôi. Nếu chuyển phôi thành công, sau 19 ± 2 ngày chuột sẽ đẻ.

Khi chuột đẻ, tiến hành ghi nhận số chuột con đẻ ra, số chuột khảm màu lông và tính toán tỷ lệ hình thành khảm trên tổng số phôi chuyển. Một trong những kinh nghiệm nhận biết con khảm là quan sát hốc mắt trước khi quan sát màu lông. Nếu chuột con đẻ ra có hốc mắt đen thì gần như đó là con khảm. Ngoài ra, chúng tôi tiến hành tách chiết DNA từ mẫu mô tai chuột khảm để tiến hành phản ứng PCR.

Kết quả chuyển phôi, số chuột con đẻ, số chuột khảm được trình bày trong bảng sau đây.

Bảng 4. Số phôi chuyển, số chuột đẻ và số chuột khảm tạo ra

Thí nghiệm	Số phôi blastocyst chuyển (chimeric blastocyst)	Số chuột nhận phôi	Số chuột có thai (đẻ)	Số chuột con được đẻ ra (chimeric mice) (%) a	Số chuột khảm màu lông (black chimeric mice) (%) b
1	90	5	1	5 (5,55%)	2 (2,22%)
2	100	5	1	3 (2,6%)	0
3	100	5	0	0	
4	80	4	0	0	
5	80	4	1	8 (10%)	1(1,25%)

Ghi chú: a: số chuột đẻ ra/số phôi chuyển; b: số chuột khảm/số phôi chuyển

Tỷ lệ tạo khảm của chuột nhắt trắng *Mus musculus* var. *albino* với tế bào dòng C57Bl/6 thấp so với hiệu quả tạo khảm của những dòng tế bào gốc phôi khác như từ dòng 129 [1].

Tác giả Frances A. Lemckert (1996) tiến hành thí nghiệm tạo khảm giữa tế bào gốc dòng C57Bl/6 và Balb/c embryo. Tỷ lệ con con sinh ra cao nhất đạt 45,5%, tỷ lệ con con sinh ra thấp nhất là 22,5%. Tỷ lệ con khảm (Black Chimeric Mouse) cao nhất đạt 30,7% và thấp nhất là 5,1 % [5, tr.917-918]. Vào năm 2008, tác giả Yoko Tanimoto và đồng tác giả tạo khảm từ dòng C57bl/6J với Balb/c embryo cũng bằng kỹ thuật vi tiêm vào blastocyst và vào phôi giai đoạn 8 tế bào, tỷ lệ con con sinh ra cao nhất đạt 45,6%, thấp nhất là 7,1%. Tỷ lệ con khảm (Black Chimeric Mouse) cao nhất đạt 15,1% thấp nhất là 5,3%. William T. Poueymirou và đồng tác giả (2007) trong công trình nghiên cứu của mình đăng trên tạp chí Nature Biotechnology đã công bố họ đạt được 96% con khảm có sự di cư vào dòng tế bào gốc sinh dục khi tiến hành

vi tiêm nhiều dòng mES vào phôi tứ bội giai đoạn 8 tế bào, và đạt tỷ lệ 66% khi tiêm vào blastocyst. Tác giả đã sử dụng sự hỗ trợ của hệ thống XY laser để tiến hành phá một lỗ nhỏ trên màng khi vi tiêm ở giai đoạn 8 tế bào. Và từ đó tác giả đề nghị vi tiêm vào phôi tứ bội giai đoạn 8 tế bào rất hiệu quả để tạo ra con khảm mạnh với hiệu quả di cư vào tế bào mầm sinh dục xấp xỉ 100% [10].

Tỷ lệ con con sinh ra của nhóm thực hiện cao nhất đạt 10%, thấp nhất là 2,6%. Tỷ lệ chuột khảm màu đen (Black Chimeric Mouse) cao nhất đạt 2,22% và thấp nhất là 0,84% (Hình 8). Tỷ lệ này so với tất cả các bài báo nhóm tham khảo đều thấp hơn. Tuy nhiên, bước đầu nhóm đã thành công khi áp dụng quy trình vi tiêm tạo con khảm. Mặt khác, dòng chuột nhắt trắng tại Việt Nam là dòng Swiss nên đây cũng là một hạn chế khá lớn để cải thiện tỷ lệ tạo khảm. Đa phần chuột được sử dụng tạo khảm với dòng C57Bl/6 là dòng chuột bạch Balb/c [1, tr.22-29], [6, tr.14-20].



Hình 8. Ô chuột khảm và chuột khảm 8 tuần tuổi

3.5. Kết quả kiểm tra sự di cư mES vào dòng tế bào mầm sinh dục chuột khảm

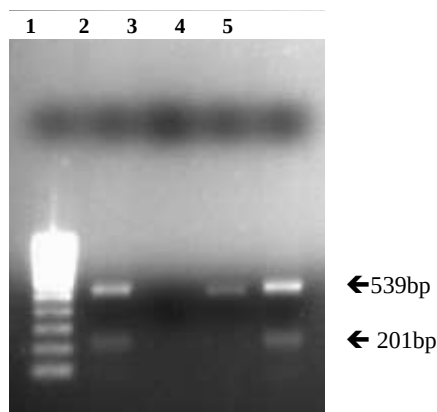


Hình 9. Chuột cái ghép với đực khảm để ô chuột 7 con trong đó có 5 con đen và được 1,5 tuần tuổi

Trong hầu hết các bài báo tạo khảm, để kiểm tra sự di cư vào dòng tế bào mầm sinh dục, các nhà nghiên cứu tiến hành cho lai chuột khảm và chuột C57Bl/6 và chuột bạch Balb/c. Tuy nhiên, trong điều kiện hiện tại, chúng tôi tiến hành cho chuột khảm đực lai với chuột nhắt trắng cái. Kết quả chuột nhắt trắng cái đã có thai và đẻ ra chuột con đen. Từ kết quả bước đầu này, chúng tôi kết luận đã có sự di cư vào dòng tế bào mầm sinh dục của chuột khảm đực (Hình 9).

3.6. Kết quả kiểm tra gene đặc hiệu của chuột dòng C57Bl/6 trên chuột khảm bằng kỹ thuật PCR

Chúng tôi sử dụng primer D18Mit145 để phát hiện gene đặc hiệu của chuột dòng C57Bl/6 [6, tr.14-20]. Đoạn primer này mã hóa cho đoạn gene nằm trên nhiễm sắc thể 18. (J:34136; Genetic and Physical Maps of the Mouse, Database Release). Đối chứng nội, chúng tôi dùng β -actin có sản phẩm 539bp.



Hình 10. Kết quả PCR phát hiện gene đặc hiệu chuột C57Bl/6

Chú thích: 1. Thang chuẩn DNA 100bp (mỗi vạch cách nhau 100bp); 2. Mẫu chứng dương (tế bào gốc chuột dòng C57BL/6, mẫu e); 3. Mẫu chứng âm PCR (nước cất); 4. Mẫu chuột nhắt trắng; 5. Mẫu con khảm 3 tuần tuổi (mẫu d)

4. KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã tiến hành nuôi cấy tế bào gốc phôi dòng C57BL/6 trong môi trường knockout DMEM bổ sung 15% KSR thay cho FBS cổ điển với sự hiện diện LIF ngoại sinh nồng độ 10^3 IU/ml, tế bào gốc phôi đã tăng sinh mạnh, không biệt hóa. Bằng kỹ thuật vi tiêm mES vào blastocyst, chúng tôi

chứng minh mES dòng C57BL/6 đã tạo khả năng với blastocyst chuột nhắt trắng *Mus musculus* var. *albino* và đã có sự di cư vào dòng tế bào mầm sinh dục ở chuột khảm thu được. Tỷ lệ con khảm (Black Chimeric Mouse) đạt 2,22%. Kết quả nghiên cứu này sẽ là tiền đề cho những nghiên cứu tiếp theo về chuyển gene vào tế bào gốc và tạo chuột mang các gene mong muốn.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Ana Claudia Carstea, Melinda K Pirity, Andras Dinnyes (2009), *Germline competence of mouse ES and iPS cell lines: Chimera technologies and genetic background*, *World J Stem Cells*, December 31; 1(1).
- [2] Baharvand H, Matthaie KI. (2004), Culture condition difference for establishment of new embryonic stem cell lines from the C57BL/6 and BALB/c mouse strains, *In Vitro Cell Dev Biol* 40.
- [3] Brigid Hoagan, Rosa Beddington, Frank Costantini, Elizabeth Lacy (1994), *Manipulating the Mouse Embryo*, *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.
- [4] Evans MJ & Kaufman M (1981), *Establishment in culture of pluripotent stem cells from mouse embryos*. *Nature*, 292.
- [5] Frances A. Lemckert, Jonathon D. Sedgwick and Heinrich Körner (1997), Gene targeting in C57BL/6 ES cells, Successful germ line transmission using recipient BALB/c blastocysts developmentally matured in vitro, *Nucleic Acids Research*, Vol. 25, No. 4.
- [6] Kimi Araki, Naoki Takeda, Atsushi Yoshiki, Yuichi Obata, Naomi Nakagata, Toshihiko Shiroishi, Kazuo Moriwaki, Ken-ichi Yamamura (2009), *Establishment of germline-competent embryonic stem cell lines from the MSM/Ms strain*. *Mamm Genome* 20.
- [7] Marten H. Hofker, Jan van Deursen (2003), *Transgenic Mouse Methods and Protocols*. *Humana Press Inc*.
- [8] Phan Kim Ngọc, Phạm Văn Phúc, Trương Đình (2007), *Công nghệ tế bào gốc*, Nxb Giáo dục.
- [9] Trần Cẩm Tú (2005), *Cutting and in vitro culture of mouse embryo (Mus musculus var. albino)*, The 2nd Asian Reproductive Biotechnology Conference–Thailand.
- [10] William T Poueymirou, Wojtek Auerbach, David Friendewey, Joseph F Hickey, Jennifer M Escaravage, Lakeisha Esau, Anthony T Dore', Sean Stevens, Niels C Adams, Melissa G Dominguez, Nicholas W Gale, George D Yancopoulos, Thomas M DeChiara & David M Valenzuela (2007), F0 generation mice fully derived from genotargeted embryonic stem cells allowing immediate phenotypic analyses. *Nature biotechnology* volume 25 number 1 January.

Ngày nhận bài: 18-4-2018. Ngày biên tập xong: 04-9-2018. Duyệt đăng: 24-9-2018