

**NGHIÊN CỨU NÂNG CAO HIỆU QUẢ TẠO PHÔI BÒ BẰNG THỤ TINH TRONG ỐNG NGHIỆM**

Đỗ Thị Kim Lành<sup>1\*</sup>, Nguyễn Thị Ngọc Anh<sup>1</sup>, Hoàng Thị Kim Chi<sup>1</sup>,  
Nguyễn Thị Hồng Nhung<sup>1</sup>, Nguyễn Bá Trường<sup>1</sup>, Sử Thanh Long<sup>1</sup>, Nguyễn Văn Thành<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Khoa Thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam  
<sup>2</sup>Phòng Thí nghiệm trọng điểm Công nghệ tế bào, Viện Chăn nuôi

\*Tác giả liên hệ: dtkclanh@vnua.edu.vn

Ngày nhận bài: 18.08.2020

Ngày chấp nhận đăng: 07.12.2020

**TÓM TẮT**

Nghiên cứu được thực hiện nhằm nâng cao hiệu quả tạo phôi bò thụ tinh trong ống nghiệm. Tế bào trứng bò được nuôi thành thực trong môi trường BO-IVM hoặc TCM-199 và đánh giá tỷ lệ thành thực bằng phương pháp nhuộm orcein; và được thụ tinh trong ống nghiệm ở nồng độ 1, 2 hoặc  $5 \times 10^6$  tinh trùng/ml trong 3, 6 hoặc 12 giờ để tìm ra điều kiện tối ưu. Sau đó, các hợp tử được chuyển qua nuôi trong môi trường nuôi phôi SOF có hoặc không có tế bào cumulus đến giai đoạn phôi nang vào ngày 7. Không có sự khác biệt đáng kể về tỷ lệ tế bào trứng thành thực khi nuôi trong môi trường BO-IVM hoặc TCM-199. Trứng bò thụ tinh trong ống nghiệm với nồng độ  $2 \times 10^6$  tinh trùng/ml trong 6 giờ cho tỷ lệ thụ tinh và tỷ lệ phôi nang cao nhất. Tỷ lệ phân chia và tỷ lệ phôi nang của phôi bò thụ tinh trong ống nghiệm được nuôi trong môi trường SOF có chứa tế bào cumulus cao hơn so với môi trường không có tế bào cumulus (76,34% so với 54,23%,  $P < 0,05$ ; và 34,16% so với 27,22%,  $P < 0,05$ ). Để nâng cao hiệu quả tạo phôi bò *in vitro*, tế bào trứng sau khi được nuôi thành thực trong môi trường TCM-199, cho thụ tinh với nồng độ  $2 \times 10^6$  tinh trùng/ml trong 6 giờ và nuôi phôi trong môi trường SOF có bổ sung tế bào cumulus.

Từ khoá: Trứng bò, thụ tinh ống nghiệm, tế bào cumulus, phôi bò *in vitro*.

**Improvement of the Efficiency of Bovine *in vitro* Fertilization Embryo Production****ABSTRACT**

The present study was conducted to improve the efficiency of *in vitro* production of bovine embryos. Bovine oocytes were matured either in BO-IVM or TCM199 medium then evaluated the maturation rates by orcein staining. After maturation, bovine oocytes were *in vitro* fertilized (IVF) in a medium with frozen-thawed sperms at different concentrations (1, 2, or  $5 \times 10^6$  sperms/ml) for 12 hours. The fertilization process was then evaluated at 3, 6 or 12h of oocytes and sperms co-incubation to determine the optimal sperm concentration and co-incubation time. Denuded zygotes were then transferred into SOF medium with or without pre-cultured cumulus cell to evaluate the cleavage rates at day 3 and blastocyst formation rates at day 7. There was no significant difference in the maturation rate of bovine oocytes cultured in BO-IVM or TCM199. Fertilization of bovine oocytes with frozen-thawed sperms at  $2 \times 10^6$  sperms/ml for 6 h significantly improve the fertilization rate and blastocyst formation rate (69.87% and 29.1%). The cleavage rate and blastocyst rate of cattle fertilized oocytes cultured in SOF medium with pre-cultured cumulus cells were higher than those of embryos cultured without cumulus cells (76.34% and 34.16% vs 54.23% and 27.22%,  $P < 0.05$ ). The optimal conditions for *in vitro* produced cattle embryos can be performed as the maturation of the oocytes with TCM199 medium, fertilization at  $2 \times 10^6$  sperms/ml for 6 hours, then cultured in SOF medium with pre-cultured cumulus cells.

Keywords: Bovine oocyte, *in vitro* fertilization, cumulus cell, bovine embryo.

**1. ĐẶT VẤN ĐỀ**

Công nghệ phôi ngày nay được hiểu như một tổ hợp các kỹ thuật sinh sản, di truyền, sinh học tế bào và phân tử nhằm sử dụng hợp lý các

nguồn nguyên liệu mang thông tin di truyền (tinh trùng, trứng, tế bào sinh dưỡng). Sự kết hợp và ứng dụng các kỹ thuật trên giúp chủ động nâng cao năng suất vật nuôi (Haley & Visscher, 1998), tạo ra các động vật có đặc tính

di truyền quý hoặc đặc biệt với mục đích phục vụ các nghiên cứu y sinh học (Illmensee, 2002); công nghệ phôi đồng thời góp phần bảo tồn sự đa dạng của các nguồn gen thông qua việc thành lập các ngân hàng tế bào sống (Prentice & Anzar, 2011). Giống như trên các loài động vật khác, quá trình tạo phôi trong ống nghiệm ở bò bao gồm ba bước kỹ thuật chính: nuôi thành thực tế bào trứng, thụ tinh trong ống nghiệm và nuôi phôi *in vitro*.

Công nghệ phôi bò đã có những bước tiến đáng kể từ khi con bê thụ tinh ống nghiệm đầu tiên được ra đời tại Hoa Kỳ vào năm 1982 (Brackett & cs., 1982). Bê đực này là kết quả của quá trình thụ tinh trong ống nghiệm giữa các tinh trùng tươi với trứng đã thành thực *in vivo*. Sau đó, hợp tử được cấy ngay vào vòi trứng bò nhận. Những năm tiếp theo, tại nhiều phòng thí nghiệm trên thế giới, các kỹ thuật liên quan công nghệ phôi trên tiếp tục được nghiên cứu theo hướng cải tiến các điều kiện nuôi trứng thành thực trong ống nghiệm (Sirard & cs., 1988), kiện toàn năng lực thụ tinh của tinh trùng (Parrish & cs., 1988), thụ tinh ống nghiệm, nuôi phôi (Greve & Madison 1991), xác định giới tính phôi bằng kỹ thuật PCR (Sachan & cs., 2020), khai thác trứng trên động vật sống với sự giúp của máy siêu âm (Ovum Pick Up - OPU) để thụ tinh ống nghiệm (Greve & Madison, 1991; Presicce & cs., 2020). Với các kỹ thuật ngày càng tiến bộ, tạo phôi động vật đang phát triển ngày càng mạnh theo hướng nghiên cứu và thương mại hoá sản phẩm. Theo báo cáo của Hiệp hội cấy truyền phôi quốc tế (IETS) trong năm 2018 có khoảng 500 nghìn phôi bò *in vivo* và hơn 1 triệu phôi *in vitro* được tạo ra trong đó hơn 1 triệu phôi được cấy cho bò nhận (Viana, 2019). Tuy nhiên, hiệu quả tạo và sử dụng phôi bò *in vitro* còn thấp do ảnh hưởng bởi nhiều yếu tố như: nguồn gốc và giai đoạn phát triển của tế bào trứng không rõ ràng nên chất lượng tế bào trứng không đảm bảo; chất lượng và khả năng thụ tinh của tinh đông lạnh cũng phụ thuộc vào cá thể, lô khai thác; môi trường và điều kiện nuôi phôi sau IVF; hơn nữa, phôi bò *in vitro* sau cấy chuyển cũng thể hiện khả năng phát triển kém hơn hẳn so với phôi bò *in vivo* (Farin & cs., 2006). Trong những năm gần đây, hiệu quả

tạo phôi bò *in vitro* đã được cải thiện đáng kể với tỷ lệ trứng thành thực đạt từ 85-90%, tỷ lệ thụ tinh (tính bằng tỷ lệ phân chia của phôi 48 giờ sau IVF) đạt từ 70-85% và tỷ lệ phôi nang dao động từ 20-40% (Ferré & cs., 2020).

Tại Việt Nam, công nghệ phôi được nghiên cứu tại Viện Khoa học và Công nghệ Việt Nam từ năm 1978. Tuy nhiên, thành công trên các đối tượng vật nuôi như tạo phôi trâu và bò bằng phương pháp thụ tinh ống nghiệm chỉ được công bố sau đó (Nguyễn Thị Ước & cs., 1999; Lê Văn Ty & cs., 2005) với tỷ lệ phôi nang đạt 26%. Tại Viện Chăn nuôi, Nguyễn Thị Thoa & cs. (2009) lần đầu tiên báo cáo về việc tạo được phôi lợn *in vitro* với tỷ lệ phôi nang đạt 13,9%. Các kết quả tạo phôi trên động vật thực hiện tại Học viện Nông nghiệp Việt Nam cũng được công bố gần đây (Đỗ Thị Kim Lành & cs., 2018; 2020) với kết quả tỷ lệ nuôi thành thực trứng lợn đạt 90% và tỷ lệ hình thành phôi nang trên lợn đạt trên 30%. Nhìn chung, các thông tin liên quan đến nghiên cứu trên công nghệ phôi động vật ở Việt Nam còn hạn chế về cả số lượng và chất lượng. Để bắt kịp xu hướng thế giới về thương mại hoá phôi bò cũng như ứng dụng các công nghệ phôi động vật trong các nghiên cứu y sinh học chuyên sâu, nâng cao hiệu quả tạo phôi trong phòng thí nghiệm đóng vai trò quan trọng. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm tìm ra môi trường nuôi thành thực trứng, môi trường thụ tinh ống nghiệm, nồng độ tinh trùng thích hợp và điều kiện nuôi phôi tối ưu nhằm nâng cao hiệu quả tạo phôi bò trong phòng thí nghiệm, góp phần tạo nguồn nguyên liệu phôi bò chất lượng cho sản xuất thương mại và các nghiên cứu chuyên sâu.

## 2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

### 2.1. Vật liệu

Đối tượng nghiên cứu chính là tế bào trứng và phôi bò nuôi cấy trong ống nghiệm nhằm đánh giá hiệu quả của môi trường nuôi cấy tế bào trứng, môi trường thụ tinh và môi trường nuôi phôi bò *in vitro*. Tế bào trứng được thu từ buồng trứng bò thịt sau khi giết mổ tại địa bàn huyện Đông Anh - Hà Nội và tỉnh Bắc Ninh và vận chuyển về phòng thí nghiệm trong vòng 3

giờ trong dung dịch nước muối sinh lý 0,9% có bổ sung 1% kháng sinh. Tinh bò thịt đông lạnh sử dụng cho thụ tinh ống nghiệm được mua từ Trạm Nghiên cứu và Sản xuất tinh bò Moncada.

## 2.2. Phương pháp nghiên cứu

### 2.2.1. Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy đến tỷ lệ thành thực của tế bào trứng bò *in vitro*

Khoảng 50 tế bào trứng loại A và B (Wurth & Kruij, 1992) được thu từ các nang noãn có kích thước từ 3-6mm và nuôi trong 500 $\mu$ l môi trường nuôi trứng bao gồm TCM199 chứa muối Earle's (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) bổ sung 0,6mM cysteine (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 0,02 AU/ml follicle stimulating hormone (FSH - Kyoritsu-seiyaku Co., Tokyo, Nhật Bản), 5% huyết thanh bê (FBS; Invitrogen), và 50  $\mu$ g/ml gentamicin (Sigma-Aldrich) hoặc trong môi trường mua sẵn BO-IVM (IVF Bioscience, Anh) trong 22 giờ, nuôi trong đĩa 4 giếng (SPL life science, Hàn Quốc). Quá trình nuôi trứng được thực hiện ở 38,5°C trong tủ cấy chứa 5% CO<sub>2</sub>, độ ẩm không khí bão hoà (Mori & cs., 2002). Sau 22 giờ nuôi cấy, các tế bào trứng được loại bỏ lớp tế bào cận noãn (cumulus) bằng dung dịch hyaluronidaza (150IU) và tác động cơ học bằng pipet thuỷ tinh. Sau đó tế bào trứng được nhuộm bằng thuốc nhuộm orcein và đánh giá các giai đoạn phát triển của nhân dưới kính hiển vi soi nổi có phóng đại 40 lần.

### 2.2.2. Ảnh hưởng của nồng độ tinh trùng và thời gian thụ tinh đến tỷ lệ thụ tinh của trứng bò sau IVM và khả năng phát triển của phôi bò sau IVF

Trứng bò sau IVM được thụ tinh trong ống nghiệm sử dụng tinh bò đông lạnh ở nồng độ 1, 2 hoặc 5  $\times 10^6$  tinh trùng/ml. Quá trình thụ tinh được thực hiện trong 12 giờ, ở 38,5°C, 5% CO<sub>2</sub>, độ ẩm không khí bão hoà. Sau thời gian thụ tinh, một phần tế bào trứng sẽ được nhuộm orcein để đánh giá tỷ lệ thụ tinh, phần còn lại được chuyển sang môi trường nuôi phôi IVC để đánh giá khả năng phát triển và hình thành phôi nang.

Sau khi xác định được nồng độ tinh trùng tối ưu để thụ tinh trong ống nghiệm, ảnh hưởng của thời gian thụ tinh đến tỷ lệ thụ tinh của trứng bò nuôi *in vitro* và khả năng hình thành phôi nang của phôi bò sau IVF được đánh giá nhằm xác định thời gian thụ tinh tối ưu. Trứng bò sau IVM được cấy trung với tinh trùng ở nồng độ tối ưu đã tìm được trong 3, 6 hoặc 12 giờ ở 38,5°C, 5% CO<sub>2</sub>, độ ẩm không khí bão hoà. Đánh giá tỷ lệ thụ tinh và tỷ lệ hình thành phôi nang được thực hiện như trên.

### 2.2.3. Ảnh hưởng của tế bào cumulus đến khả năng phát triển của phôi bò

Tế bào cumulus được phân lập từ lớp tế bào cumulus loại ra sau IVM trong môi trường nuôi cấy DMEM (Gibco, Hoa Kỳ) chứa 10% FBS và 1  $\mu$ g/ml gentamicin. Khi quan sát tế bào phát triển tới mật độ 80-100% bề mặt đĩa thì tiến hành cấy chuyển và duy trì đến lần cấy chuyển thứ 10.

Sau IVF, hợp tử được loại bỏ màng cumulus và tinh trùng bám dính và chuyển sang môi trường nuôi phôi SOF(-) bổ sung 1  $\mu$ g/ml insulin (Sigma-Aldrich), 0,4% BSA và 1  $\mu$ g/ml gentamicin ở 38,5°C trong tủ cấy chứa 5% CO<sub>2</sub>, độ ẩm không khí bão hoà. Sau 3 ngày, phôi được chuyển sang môi trường SOF(+) chứa 1  $\mu$ g/ml insulin, 5% FBS và 1  $\mu$ g/ml gentamicin ở 38,5°C trong tủ cấy chứa 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub>, và 90% N<sub>2</sub>. Để đánh giá ảnh hưởng của tế bào cumulus đến khả năng phát triển của phôi sau IVF, chúng tôi tiến hành nuôi phôi trong đĩa cấy có hoặc không có lớp tế bào cumulus bám trên bề mặt đĩa cấy. Tỷ lệ phôi phân chia được đánh giá vào ngày thứ 3 và tỷ lệ hình thành phôi nang được đánh giá vào ngày thứ 7 của quá trình nuôi phôi.

## 2.3. Xử lý số liệu

Các chỉ tiêu được đánh giá bao gồm tỷ lệ tế bào trứng phát triển đến giai đoạn đầu của giảm phân II (tỷ lệ thành thực), tỷ lệ thụ tinh, tỷ lệ hình thành phôi nang. Số liệu được phân tích phương sai (one way ANOVA), sử dụng mô hình tuyến tính chung (GLM). Khi các tương tác đáng kể không được quan sát thấy giữa hai

tham số, chúng được loại trừ khỏi mô hình. Các khác biệt với giá trị  $P \leq 0,05$  được xem là có ý nghĩa thống kê.

### 3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

#### 3.1. Ảnh hưởng của môi trường nuôi trứng đến tỷ lệ thành thực của trứng

Tế bào trứng có chất lượng loại A và B được đưa vào nuôi trong môi trường BO-IVM và TCM 199. Thí nghiệm được thực hiện qua 5 lần nhắc lại, mỗi lần từ 16-25 trứng/lô thí nghiệm được đánh giá. Kết quả trứng thành thực sau 22 giờ được trình bày qua bảng 1.

Trong môi trường BO-IVM, số tế bào trứng

thành thực là 104 trứng trên tổng số 120 trứng đạt tỷ lệ  $83,42 \pm 5,67\%$  không có sự khác biệt đáng kể với tỷ lệ thành thực của tế bào trứng nuôi trong môi trường TCM 199 ( $78,85 \pm 3,78\%$ ). Đồng thời cũng không có sự khác biệt giữa tỷ lệ tế bào trứng vượt qua giai đoạn túi mầm (GVBD) khi nuôi trong hai môi trường kể trên ( $98,8\%$  và  $97,65\%$ ).

Môi trường BO-IVM là môi trường mua sẵn với giá thành cao, môi trường TCM199 là môi trường được chuẩn bị tại phòng thí nghiệm với giá thành rẻ hơn. Từ kết quả của thí nghiệm trên, chúng tôi lựa chọn môi trường TCM 199 làm môi trường nuôi thành thực trứng bò trong các thí nghiệm tiếp theo.

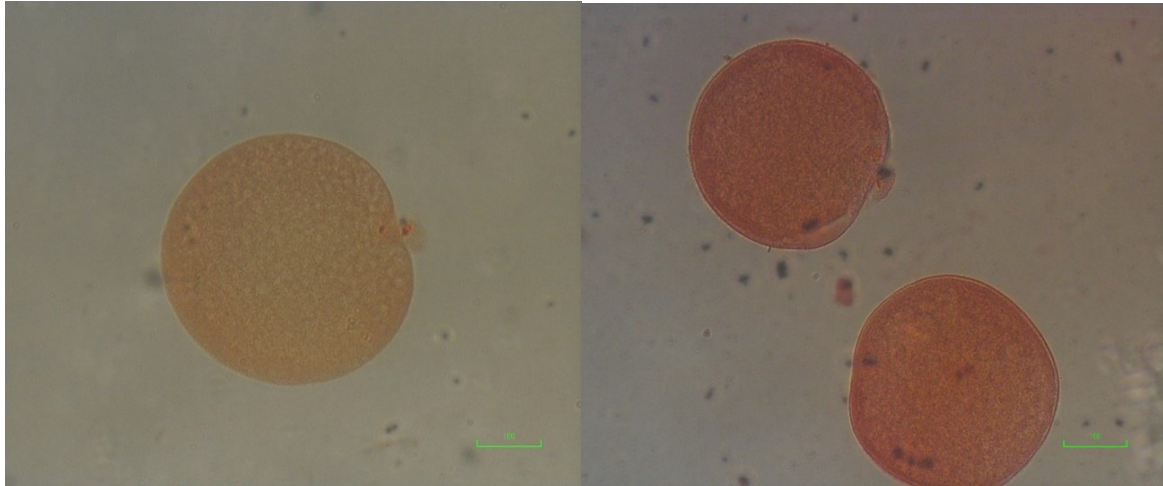
**Bảng 1. Ảnh hưởng của môi trường nuôi đến sự thành thực của trứng bò**

Môi trường	Số trứng nghiên cứu	Số trứng vượt qua giai đoạn túi mầm (GVBD, %)	Số trứng thành thực (%)
TCM 199	88	86 ( $97,65 \pm 2,35$ )	68 ( $78,85 \pm 3,78$ )
BO-IVM	120	118 ( $98,8 \pm 0,78$ )	104 ( $83,42 \pm 5,67$ )

Ghi chú: Số liệu được biểu diễn dưới dạng: giá trị trung bình (Mean)  $\pm$  sai số chuẩn (SEM); Số lần nhắc lại thí nghiệm  $n = 5$



**Hình 1. Tế bào trứng bò loại A (chỉ mũi tên đen) và B (chỉ mũi tên trắng)**



**Hình 2. Tế bào trứng bò thành thực nhuộm Orcein**  
(nhiễm sắc thể ở trạng thái Metaphase II)

**Bảng 2. Ảnh hưởng của nồng độ tinh trùng đến tỷ lệ thụ tinh trong ống nghiệm**

Nồng độ tinh trùng	Số trứng nghiên cứu (n)	Số trứng được thụ tinh (%)
$1 \times 10^6$ tinh trùng/ml	52	20 (37,53 <sup>a</sup> ± 2,37)
$2 \times 10^6$ tinh trùng/ml	49	33 (67,83 <sup>b</sup> ± 3,6)
$5 \times 10^6$ tinh trùng/ml	57	31 (52,78 <sup>b</sup> ± 6,79)

Ghi chú: Số liệu được biểu diễn dưới dạng: giá trị trung bình (Mean) ± sai số chuẩn (SEM); Số lần nhắc lại thí nghiệm là 4-5 lần; Trong cùng một cột, các chữ cái khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê  $P < 0,05$ .

### 3.2. Ảnh hưởng của nồng độ tinh trùng và thời gian thụ tinh đến tỷ lệ thụ tinh của trứng bò và khả năng phát triển của phôi

#### 3.2.1. Ảnh hưởng của nồng độ tinh trùng đến tỷ lệ thụ tinh của trứng bò sau IVM

Tinh bò thịt đông lạnh được giải đông trong nước ấm 37°C trong 30 giây. Sau đó, loại bỏ các môi trường đã sử dụng để bảo quản tinh trùng bằng cách ly tâm trong môi trường IVF và pha loãng tinh trùng ở các nồng độ khác nhau:  $1 \times 10^6$ /ml,  $2 \times 10^6$ /ml hoặc  $5 \times 10^6$ /ml. Mỗi lô thí nghiệm được lặp lại từ 4 (nồng độ  $2 \times 10^6$  tinh trùng/ml) đến 5 (1 và  $5 \times 10^6$  tinh trùng/ml) lần, mỗi lần từ 10-15 trứng được đánh giá. Kết quả thụ tinh thực hiện trong 12 giờ được trình bày ở bảng 2.

Trong cơ thể sống, chỉ một vài tinh trùng bơi ngược đến vị trí thụ tinh để gặp tế bào trứng, tỷ lệ tinh trùng/tế bào trứng nằm trong khoảng 1:1 (Hunter, 1993). Tuy nhiên để đảm bảo tỷ lệ thụ tinh và tỷ lệ phân chia của phôi

trong thụ tinh trong ống nghiệm, nồng độ tinh trùng thường nằm trong khoảng  $0,5 \times 10^6$ - $5 \times 10^6$  tinh trùng/ml (Gordon, 2003). Trong nghiên cứu này, tỷ lệ thụ tinh của trứng trong môi trường có nồng độ tinh trùng  $2 \times 10^6$  và  $5 \times 10^6$  lần lượt là 67,83% và 52,78% cao hơn đáng kể so với tỷ lệ thụ tinh của tế bào trứng nuôi trong môi trường có nồng độ tinh trùng ở  $1 \times 10^6$  (37,53%,  $P < 0,05$ ).

#### 3.2.2. Ảnh hưởng của nồng độ tinh trùng đến khả năng phát triển của phôi bò sau IVF

Nồng độ tinh trùng có ảnh hưởng đáng kể đến khả năng phân chia và phát triển đến giai đoạn phôi nang của hợp tử (Ward & cs., 2002). Do đó, việc xác định nồng độ tinh trùng phù hợp giúp đảm bảo tỷ lệ tế bào trứng được thụ tinh cao nhưng tỷ lệ thụ tinh đa tinh trùng lại ở mức thấp nhất. Mục đích của thí nghiệm là đánh giá ảnh hưởng của nồng độ tinh trùng đến khả năng phát triển của phôi bò sau thụ tinh trong ống nghiệm. Thí nghiệm được tiến hành với ba nồng độ tinh  $1 \times 10^6$ ,  $2 \times 10^6$  (6 lần nhắc lại) và  $5 \times 10^6$

(5 lần nhắc lại) với tổng số tế bào trứng lần lượt là 216, 203 và 174 trứng. Kết quả được thể hiện qua bảng 3.

Kết quả trong bảng 3 cho thấy, nồng độ tinh  $2 \times 10^6$  cho tỷ lệ phôi phân chia và tỷ lệ hình thành phôi nang cao hơn, có 142 phôi phân chia trong tổng số 203 trứng được thụ tinh, đạt 69,87% so với 41,83% và 47,46% ( $P \leq 0,05$ ); tỷ lệ phôi nang đạt 29,1% so với 11,26% và 20,53% ( $P \leq 0,05$ ). Như vậy, để đạt hiệu quả tạo phôi cao trong quá trình thụ tinh ống nghiệm và tiết kiệm được liều tinh, nồng độ tinh trùng  $2 \times 10^6$ /ml đã được lựa chọn cho các thí nghiệm tiếp theo.

### 3.2.3. Ảnh hưởng của thời gian thụ tinh đến tỷ lệ thụ tinh của trứng bò sau IVM

Sumantri & cs. (1997) đã chỉ ra rằng, để đạt được tỷ lệ thụ tinh cao nhất, tinh trùng khai thác từ các giống bò khác nhau cần thời gian thụ tinh

kéo dài khác nhau. Để nâng cao hiệu quả tạo phôi, quá trình thụ tinh ống nghiệm được thực hiện với nồng độ tinh trùng trong môi trường thụ tinh là  $2 \times 10^6$  tinh trùng/ml, thời gian thụ tinh kéo dài 3, 6 (5 lần nhắc lại) hoặc 12 giờ (4 lần nhắc lại) với số trứng sử dụng trong các lô lần lượt là 54, 57 và 45 trứng (Bảng 4).

Kết quả trong bảng 4 cho thấy, nhóm trứng có thời gian thụ tinh kéo dài 6 và 12 giờ có tỷ lệ thụ tinh lần lượt là 63,2% và 61,5%, cao hơn đáng kể so với tỷ lệ thụ tinh của tế bào trứng được nuôi thụ tinh trong 3 giờ (38,9%,  $P < 0,05$ ). Kết quả này có sự tương đồng với nghiên cứu của Ward & cs. (2002), thời gian thụ tinh trong 1 giờ làm hạn chế tỷ lệ phôi phân chia trong khi kéo dài từ 5-10 giờ cho tỷ lệ phôi phân chia đến 76%. Từ kết quả của thí nghiệm cho thấy thời gian thích hợp cho quá trình thụ tinh trong ống nghiệm của trứng bò là 6 giờ.

**Bảng 3. Ảnh hưởng của nồng độ tinh trùng đến tỷ lệ phôi phân chia và số lượng phôi nang (ngày thứ 7)**

Nồng độ tinh	Số trứng nghiên cứu	Số phôi phân chia (%)	Số phôi nang (%)
$1 \times 10^6$ tinh trùng/ml	216	88 (41,83 <sup>a</sup> ± 6,31)	24 (11,26 <sup>c</sup> ± 1,85)
$2 \times 10^6$ tinh trùng/ml	203	142 (69,87 <sup>b</sup> ± 4,07)	59 (29,1 <sup>d</sup> ± 4,11)
$5 \times 10^6$ tinh trùng/ml	174	82 (47,46 <sup>a</sup> ± 3,27)	35 (20,53 <sup>e</sup> ± 1,49)

Ghi chú: Số liệu được biểu diễn dưới dạng: giá trị trung bình (Mean) ± sai số chuẩn (SEM); Số lần nhắc lại thí nghiệm là 5-6 lần; Trong cùng một cột, các chữ cái khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê  $P < 0,05$ .

**Bảng 4. Ảnh hưởng của thời gian thụ tinh đến tỷ lệ thụ tinh**

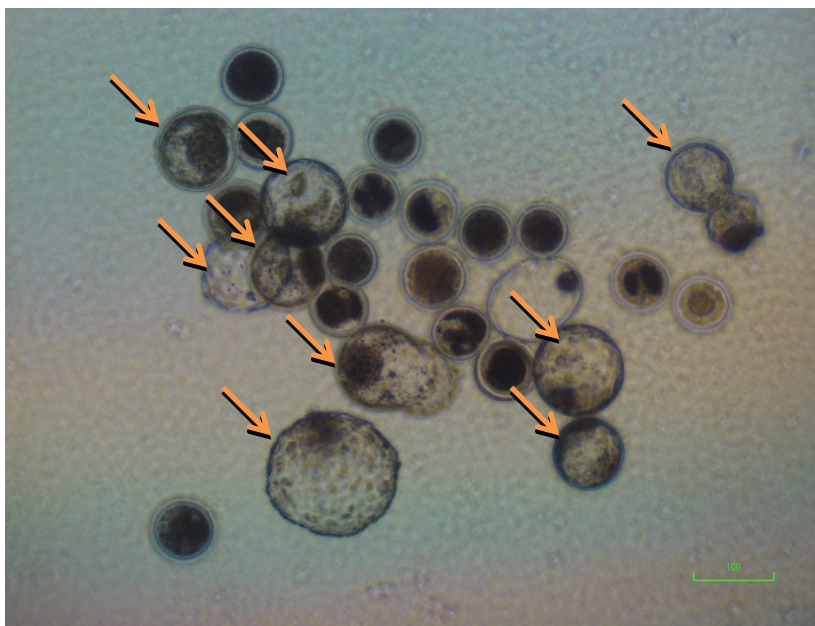
Thời gian thụ tinh (giờ)	Số trứng (n)	Số trứng thụ tinh (%)
3	54	21 (38,86 <sup>a</sup> ± 2,67)
6	57	36 (63,21 <sup>b</sup> ± 3,11)
12	45	28 (61,48 <sup>b</sup> ± 7,19)

Ghi chú: Số liệu được biểu diễn dưới dạng: giá trị trung bình (Mean) ± sai số chuẩn (SEM); Số lần nhắc lại thí nghiệm là 4-5 lần; Trong cùng một cột, các chữ cái khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê  $P < 0,05$ .

**Bảng 5. Khả năng phát triển của phôi IVF trong môi trường SOF có và không bổ sung tế bào Cumulus (CCs)**

Điều kiện nuôi cấy	Số phôi nghiên cứu (n)	Số phôi phân chia (%)	Số phôi nang (%)
SOF + CC <sub>s</sub>	218	168 (76,38 <sup>a</sup> ± 2,39)	75 (34,16 <sup>c</sup> ± 0,92)
SOF	222	121 (54,23 <sup>b</sup> ± 1,49)	61 (27,22 <sup>d</sup> ± 0,72)

Ghi chú: Số liệu được biểu diễn dưới dạng: giá trị trung bình (Mean) ± sai số chuẩn (SEM); Số lần nhắc lại thí nghiệm là 5 lần; Trong cùng một cột, các chữ cái khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê  $P < 0,001$ .



**Hình 3. Phôi nang 7 ngày tuổi (chỉ mũi tên) hình thành trong điều kiện nuôi cấy chung với tế bào cumulus**

### 3.3. Nghiên cứu ảnh hưởng của tế bào cumulus đến khả năng phát triển của phôi bò sau IVF

Tế bào cận noãn (tế bào cumulus) đã được chứng minh có vai trò quan trọng trong quá trình thành thực và quá trình thụ tinh của tế bào trứng bò (Chian & cs., 1995; Zhang & cs., 1995). Sự có mặt của tế bào cumulus trong quá trình nuôi phôi còn có tác dụng làm tăng chất lượng phôi và tăng tỷ lệ thụ thai ở những bệnh nhân hiếm muộn (Guo & cs., 2016). Trong nghiên cứu này, ảnh hưởng của lớp tế bào cumulus trong đĩa cấy phôi được đánh giá nhằm lựa chọn điều kiện nuôi phôi thích hợp. Thí nghiệm được thực hiện qua 5 lần nhắc lại cho mỗi lô thí nghiệm với tổng số trứng nghiên cứu lần lượt là 218 và 222 trứng (Bảng 5).

Kết quả bảng 5 cho thấy, phôi được nuôi trong môi trường SOF với sự có mặt của tế bào cumulus phát triển tốt hơn so với nuôi trong môi trường SOF không bổ sung thêm tế bào cumulus (34,16% so với 27,22%,  $P < 0,001$ ).

## 4. KẾT LUẬN

Hai môi trường nuôi thành thực tế bào trứng bò BO-IVM và TCM-199 đều mang lại

hiệu quả cao trong việc nuôi thành thực tế bào trứng bò.

Tế bào trứng thụ tinh với nồng độ pha loãng tinh trùng  $2 \times 10^6/ml$  trong thời gian thụ tinh 6 giờ cho tỷ lệ thụ tinh, tỷ lệ hình thành phôi nang cao nhất.

Bổ sung tế bào cumulus trong môi trường nuôi phôi SOF giúp cải thiện tỷ lệ phôi phát triển đến giai đoạn phôi nang.

## LỜI CẢM ƠN

Chúng tôi chân thành cảm ơn Bộ Khoa học và Công nghệ đã tài trợ thiết bị và hoá chất thuộc đề tài “Nghiên cứu cải tạo bò Vàng Việt Nam theo hướng chuyên thịt bằng công nghệ chỉnh sửa gen (CRISPR/Cas9)” để chúng tôi thực hiện nghiên cứu này.

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Brackett B.G., Bousquet D., Boice M.L., Donawick W.J., Evans J.F. & Dressel M.A. (1982). Normal development following *in vitro* fertilization in the cow. *Biol Reprod.* 27(1): 147-158.
- Chian R.C., Okuda K. & Niwa K. (1995). Influence of cumulus cells on *in vitro* fertilization of bovine oocytes derived from *in vitro* maturation. *Animal Reproduction Science.* 38(1): 37-48.

- Đỗ Thị Kim Lành, Hoàng Thị Kim Chi, Nguyễn Thị Ngọc Anh, Nguyễn Thị Hồng Nhung, Kazuhiro Kikuchi, Takeshige Otoi, Nguyễn Thị Thu Trang & Sử Thanh Long (2020). Nghiên cứu ứng dụng môi trường nuôi thành thực trứng lợn *in vitro* phù hợp với điều kiện Việt Nam. Tạp chí Khoa học Nông nghiệp Việt Nam. 18(7): 504-509.
- Đỗ Thị Kim Lành, Sử Thanh Long, Nguyễn Thị Mai Thor, Nguyễn Đức Trường, Nguyễn Công Toàn, Nguyễn Hoài Nam & Nguyễn Văn Thành (2018). Ảnh hưởng của môi trường nuôi cấy đến khả năng thành thực và phát triển của trứng lợn nuôi thành thực trong ống nghiệm. Kỷ yếu Hội thảo khoa học. Nhà xuất bản Học viện Nông nghiệp.
- Farin P.W., Piedrahita J.A. & Farin C.E. (2006). Errors in development of fetuses and placentas from *in vitro* - produced bovine embryos. Theriogenology. 65(1): 178-191.
- Ferré L.B., Kjelland M.E., Strøbech L.B., Hyttel P., Mermillod P. & Ross P.J. (2020). Review: Recent advances in bovine *in vitro* embryo production: reproductive biotechnology history and methods. Animal. 14(5): 991-1004.
- Gordon I. (2003). Laboratory production of cattle embryos. CABI publishing 2<sup>nd</sup> edition.
- Greve T. & Madison V. (1991). *In vitro* fertilization in cattle: a review. Reprod. Nutr. Dev. 31(2): 147-157.
- Guo N., Yang F., Liu Q., Ren X., Zhao H., Li Y. & Ai J. (2016). Effects of cumulus cell removal time during *in vitro* fertilization on embryo quality and pregnancy outcomes: a prospective randomized sibling-oocyte study. Reproductive biology and endocrinology: RB&E. 14: 18-18.
- Haley C.S. & Visscher P.M. (1998). Strategies to Utilize Marker-Quantitative Trait Loci Associations. Journal of Dairy Science. 81: 85-97.
- Hunter R.H.F. (1993). Sperm: Egg ratios and putative molecular signals to modulate gamete interactions in polytocous mammals. Molecular Reproduction and Development. 35(3): 324-327.
- Illmensee K. (2002). Biotechnology in reproductive medicine. Differentiation. 69(4): 167-173.
- Lê Văn Ty, Hoàng Nghĩa Sơn & Nguyễn Mạnh Hùng (2005). Tạo phôi trâu Việt Nam bằng thụ tinh *in vitro*. Tạp chí Sinh học. 27(3): 82-87.
- Mori M., Otoi T. & Suzuki T. (2002). Correlation between the Cell Number and Diameter in Bovine Embryos Produced *In Vitro*. Reproduction in Domestic Animals. 37(3): 181-184.
- Nguyễn Thị Thoa, Lưu Ngọc Anh, Vũ Thị Thu Hương, Trần Sơn Hà, Đỗ Văn Hương & Nguyễn Thị Hương (2009). Kết quả tạo phôi lợn trong ống nghiệm sử dụng môi trường NCSU-37 10% PFF. Tạp chí Khoa học Công nghệ Chăn nuôi. 19.
- 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. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội. tr. 934-936.
- Parrish J.J., Susko-Parrish J., Winer M.A. & First N.L. (1988). Capacitation of bovine sperm by heparin. Biology of reproduction. 38(5): 1171-1180.
- Prentice J.R. & Anzar M. (2011). Cryopreservation of Mammalian Oocyte for Conservation of Animal Genetics. Veterinary Medicine International. p. 146405.
- Presicce G.A., Neglia G., Salzano A., Padalino B., Longobardi V., Vecchio D., De Carlo E. & Gasparrini B. (2020). Efficacy of repeated ovum pick-up in Podolic cattle for preservation strategies: a pilot study. Italian Journal of Animal Science. 19(1): 31-40.
- Sachan V., Kumar B., Kumar Agrawal J., Kumar A. & Saxena A. (2020). Methods of Embryo Sexing in Cattle Breeding: A Review. Iranian Journal of Applied Animal Science. 10(1): 1-8.
- Sirard M.A., Parrish J.J., Ware C.B., Leibfried-Rutledge M.L. & First N.L. (1988). The culture of bovine oocytes to obtain developmentally competent embryos. Biology of reproduction. 39(3): 546-552.
- Sumantri C., Boediono A., Ooe M., Murakami M., Saha S. & Suzuki T. (1997). The effect of sperm-oocyte incubation time on *in vitro* embryo development using sperm from a tetraparental chimeric bull. Animal Reproduction Science. 48(2): 187-195.
- Viana J. (2019). Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals. Embryo Technology Newsletter. 36.
- Ward F., Enright B., Rizos D., Boland M. & Lonergan P. (2002). Optimization of *in vitro* bovine embryo production: effect of duration of maturation, length of gamete co-incubation, sperm concentration and sire. Theriogenology. 57(8): 2105-2117.
- Wurth Y.A. & Kruip T. (1992). Bovine embryo production *in vitro* after selection of the follicles and oocytes. In: Proceedings of the 12<sup>th</sup> International Congress of Animal Reproduction, The Hague, The Netherlands. The Hague: ICAR. 1: 387-389.
- Zhang L., Jiang S., Wozniak P.J., Yang X. & Godke R.A. (1995). Cumulus cell function during bovine oocyte maturation, fertilization, and embryo development *in vitro*. Molecular Reproduction and Development. 40(3): 338-344.