

NGHIÊN CỨU ỨNG DỤNG MÔI TRƯỜNG NUÔI THÀNH THỰC TRỨNG LỢN *IN VITRO* PHÙ HỢP VỚI ĐIỀU KIỆN VIỆT NAM

Đỗ Thị Kim Lành^{1*}, Hoàng Thị Kim Chi¹, Nguyễn Thị Ngọc Anh¹, Nguyễn Thị Hồng Nhung¹,
Kazuhiro Kikuchi², Takeshige Otoi³, Nguyễn Thị Thu Trang⁴, Sử Thanh Long¹

¹Khoa Thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

²Viện nghiên cứu NARO, Nhật Bản

³Đại học Tokushima, Nhật Bản

⁴Khoa Thú y, Đại học Lâm nghiệp, Việt Nam

*Tác giả liên hệ: dtkklanh@vnua.edu.vn

Ngày nhận bài: 22.05.2020

Ngày chấp nhận đăng: 21.06.2020

TÓM TẮT

Nghiên cứu này được thực hiện nhằm đánh giá tỷ lệ thành thực của trứng lợn nuôi trong các điều kiện môi trường khác nhau để lựa chọn môi trường nuôi trứng hiệu quả, tiết kiệm, phù hợp điều kiện Việt Nam. Tế bào trứng lợn được nuôi trong môi trường porcine oocyte maturation (POM) hoặc môi trường tissue culture media 199 (TCM199), so sánh nguồn nước pha môi trường từ nước tinh khiết (Sigma) và nước khử ion sản xuất tại phòng thí nghiệm (MQW), so sánh hiệu quả bổ sung hormone trong quá trình nuôi trứng. Kết quả cho thấy tỷ lệ thành thực của trứng lợn nuôi trưởng thành trong môi trường POM ($73,45 \pm 2,61\%$) cao hơn đáng kể so với tỷ lệ thành thực của trứng lợn nuôi trong môi trường TCM199 ($58,84 \pm 2,49$). Không có sự khác biệt đáng kể về tỷ lệ thành thực của trứng lợn nuôi trong môi trường POM pha từ nước Sigma ($87,16 \pm 4,74\%$) hay nước khử ion ($83,20 \pm 6,93\%$). Bổ sung hormone trong 22 giờ đầu của quá trình IVM cho tỷ lệ thành thực cao hơn đáng kể so với bổ sung hormone trong suốt quá trình nuôi trứng ($90,88 \pm 2,33\%$ và $84,93 \pm 2,78\%$). Như vậy, sử dụng nước khử ion để pha môi trường POM nuôi trứng lợn *in vitro* và bổ sung hormone trong 22 giờ đầu nuôi cấy có hiệu quả cao trong nâng cao tỷ lệ thành thực nhân cũng như tiết kiệm chi phí nghiên cứu.

Từ khóa: Trứng lợn, thành thực, hormone.

Optimization of Porcine Oocyte *in Vitro* Maturation Medium for Application in Vietnam

ABSTRACT

The present study was conducted to evaluate the maturation rate of porcine oocytes matured in POM or TCM199 medium; in maturation, medium made from Sigma pure water or MQW and effects of hormone supplementation in the first 22 hours or during IVM. Maturation rate of porcine oocyte matured in POM ($73.45 \pm 2.61\%$) medium was significantly higher than that of TCM199 medium (58.84 ± 2.49). There was no significant difference in the maturation rate of porcine oocyte matured in POM medium made from Sigma pure water ($87.16 \pm 4.74\%$) or MQW ($83.20 \pm 6.93\%$). The supplementation of hormone in 22 hours could help to improve the maturation rate ($90.88 \pm 2.33\%$) compared to that of 46 hours ($84.93 \pm 2.78\%$). MQW can be used to prepared porcine oocyte matured medium. Supplementation of hormones during IVM1 has potential to improve the maturation rate of porcine oocytes.

Keywords: Porcine oocytes, maturation, hormones.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Trong những năm gần đây, việc sử dụng động vật làm mô hình nghiên cứu y sinh và bệnh trên người đang thu hút được sự quan tâm của nhiều nhà nghiên cứu trên thế giới. Trong đó, các nghiên cứu sử dụng lợn làm mô hình thử nghiệm

ngày càng tăng nhờ có sự tương đồng lớn với con người về giải phẫu cũng như sinh lý học (Critser & cs., 2009). Đây là thuận lợi để có thể nghiên cứu các công nghệ như tế bào gốc, kỹ thuật cấy ghép mô hay công nghệ protein tái tổ hợp trên lợn. Hơn nữa, ứng dụng các kỹ thuật sinh học phân tử, công nghệ gen và công nghệ phối để tạo

lợn biến đổi gen có giá trị lớn trong nghiên cứu bệnh trên người (Luo & cs., 2012; Prather & cs., 2013). Do đó, lợn được coi là một trong những mô hình động vật có giá trị để cung cấp nguồn tế bào và cơ quan thích hợp cho cấy ghép mô (Ramsoondar & cs., 2009), cũng như động vật chuyển gen để tạo ra các protein đặc biệt liên quan đến y sinh học trên người (Takahagi & cs., 2005; Pan & cs., 2010; Tanihara & cs., 2016). Mặt khác, lợn là nguồn thực phẩm chính cung cấp protein cũng như chất béo nên ngành chăn nuôi lợn đang rất phát triển trên nhiều quốc gia trên thế giới cũng như ở Việt Nam.

Tạo phôi trong ống nghiệm (IVP) ở động vật có vú cũng như trên lợn bao gồm ba kỹ thuật chính: (i) Sự trưởng thành trong ống nghiệm (IVM) của noãn bào được phục hồi trực tiếp từ nang trứng, (ii) Thụ tinh trong ống nghiệm (IVF) và (iii) Nuôi cấy *in vitro* (IVC) của hợp tử cho đến giai đoạn phôi nang. Trong đó, IVM là bước đầu tiên có vai trò quyết định đến kết quả tạo phôi lợn trong ống nghiệm. Ở giai đoạn này, tận dụng những tế bào trứng lợn chưa thành thực thu được từ nang trứng trên buồng trứng sau đó nuôi tế bào trứng đến giai đoạn trưởng thành rồi đưa vào thụ tinh trong ống nghiệm hoặc sử dụng làm nguyên liệu cho các nghiên cứu chuyên sâu khác như nhân bản vô tính hay vi tiêm tinh. Vì vậy, quá trình nuôi thành thực tế bào trứng không những cần thiết cho sự thành công của quá trình thụ tinh và sự phát triển của phôi mà còn là nguồn cung cấp nguyên liệu nghiên cứu quan trọng. Việc lựa chọn môi trường nuôi thành thực tối ưu là điều kiện tiên quyết dẫn đến sự thành công trong thụ tinh ống nghiệm ở lợn cũng như các công nghệ hỗ trợ sinh sản khác như nhân bản vô tính, vi tiêm tinh (ICSI) hay chỉnh sửa gen, từ đó phục vụ cho các nghiên cứu y sinh trên người.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu

Đối tượng nghiên cứu chính là trứng lợn nuôi cấy trong ống nghiệm nhằm đánh giá hiệu quả của từng loại môi trường nuôi cấy. Qua đó, lựa chọn môi trường nuôi trứng phù hợp, có hiệu quả cao và giảm chi phí sản xuất.

Buồng trứng lợn được thu tại cơ sở giết mổ gia súc, gia cầm của Công ty cổ phần Thịnh An tại xã Vạn Phúc, Huyện Thanh Trì, Hà Nội được rửa sạch và bảo quản trong dung dịch nước muối sinh lý 0,9%; giữ ở nhiệt độ 33-35°C và vận chuyển về phòng thí nghiệm trước 3 giờ sau khi giết mổ.

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Ảnh hưởng của môi trường nuôi trưởng thành POM và TCM199 đến khả năng thành thực của trứng lợn nuôi cấy *in vitro*

Tế bào trứng thu được sẽ được nuôi trưởng thành trong môi trường POM (Yoshioka & cs., 2008) chứa 10 ng/ml epidermal growth factor EGF (Sigma), 0,6mM cysteine, 1mM dibutyryl cAMP (dbcAMP; Sigma), 10 IU/ml eCG (PMS 1000 Tani NZ; Nihon Zenyaku Kogyo, Koriyama, Japan), và 10 IU/ml hCG (Puberogen, 500U; Sankyo, Tokyo, Japan) trong đĩa cấy bốn giếng (Nunclon Multidishes; Nalge Nunc International, Denmark) hoặc trong môi trường TCM199 (25mM HEPES tissue culture medium 199 with Earle's salts (TCM 199; Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA) bổ sung 10% (v/v) dịch nang trứng, 0,6mM cysteine (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 50mM sodium pyruvate (Sigma-Aldrich), 2 mg/mL D-sorbitol (Wako Pure Chemical Industries Ltd., Osaka, Japan), 1 mg/mL 17 β -estradiol (Sigma-Aldrich), 10 IU/mL equine chorionic gonadotropin (Kyoritu Seiyaku, Tokyo, Japan), 10 IU/mL human chorionic gonadotropin (Kyoritu Seiyaku), và 50 mg/mL gentamicin (Sigma-Aldrich), trong thời gian từ 20-22 giờ. Sau đó, trứng được cấy chuyển sang môi trường nuôi cấy tương đương không chứa dbcAMP và hormone trong 24 giờ. Quá trình nuôi trưởng thành trứng sẽ được tiến hành trong tủ nuôi 5% CO₂ ở 38,5°C, độ ẩm không khí bão hòa.

2.2.2. Ảnh hưởng của nguồn nước sử dụng pha môi trường nuôi trưởng thành đến khả năng thành thực của trứng lợn nuôi cấy *in vitro*

Từ thí nghiệm 1, lựa chọn môi trường POM hoặc TCM199 là môi trường nuôi thành thực tế

bào trứng lợn. Môi trường nuôi trứng được chuẩn bị tương tự như thí nghiệm 1, sử dụng hai nguồn nước khác nhau là nước tinh khiết mua sẵn (Sigma) hoặc nước khử ion sản xuất tại phòng thí nghiệm (MQW). Quá trình nuôi trưởng thành trứng sẽ được tiến hành trong tủ nuôi 5% CO₂ ở 38,5°C, độ ẩm không khí bão hòa.

2.2.3. Ảnh hưởng của việc bổ sung hormone trong môi trường nuôi thành thực trứng đến khả năng thành thực của trứng lợn nuôi cấy *in vitro*

Từ thí nghiệm 2, lựa chọn nguồn nước pha môi trường nuôi trưởng thành tế bào trứng để thực hiện nghiên cứu trong thí nghiệm 3 để đánh giá ảnh hưởng của việc bổ sung hormone (eCG và hCG) trong quá trình nuôi thành thực trứng đến tỷ lệ thành thực của trứng lợn trong điều kiện *in vitro*. Các tế bào trứng loại A và B được chọn lọc và ngẫu nhiên chia làm hai lô trứng khác nhau. Với mỗi lô thí nghiệm có khoảng 50 tế bào trứng được nuôi trong 500µL môi trường nuôi trưởng thành trứng POM có chứa 10 ng/ml epidermal growth factor EGF (Sigma), 0,6mM cysteine, 1mM dibutyryl cAMP (dbcAMP; Sigma), 10 IU/ml eCG (PMS 1000 Tani NZ; Nihon Zenyaku Kogyo, Koriyama, Japan) và 10 IU/ml hCG (Puberogen, 500U; Sankyo, Tokyo, Japan) trong đĩa cấy bốn giếng (Nunclon Multidishes; Nalge Nunc International, Denmark) trong 20-22 giờ. Sau đó, được chuyển sang môi trường nuôi cấy không chứa dbcAMP trong đĩa cấy bốn giếng trong 24 giờ chuyển sang môi trường nuôi cấy không chứa dbcAMP và hormone trong đĩa cấy bốn giếng (Nunclon Multidishes; Nalge Nunc International, Denmark) trong 24 giờ. Quá trình nuôi trưởng thành trứng sẽ được tiến hành trong tủ nuôi 5% CO₂ ở 38,5°C, độ ẩm không khí bão hòa.

2.3. Xử lý số liệu

Chỉ tiêu được đánh giá: tỷ lệ tế bào trứng phát triển đến giai đoạn đầu của giảm phân II (tỷ lệ thành thực). Số liệu được phân tích phương sai (ANOVA), sử dụng mô hình tuyến tính chung (GLM) của SAS dành cho Windows, phiên bản 9.1, (Hoa Kỳ). Khi các tương tác đáng kể không được quan sát 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 trưởng thành POM và TCM199 tới sự thành thực của trứng lợn nuôi *in vitro*

Nuôi thành thực trứng lợn là bước khởi đầu cho các nghiên cứu chuyên sâu như thụ tinh ống nghiệm, nhân bản vô tính, vi tiêm tinh hay tạo dòng tế bào mầm gốc phôi... bởi chỉ những tế bào trứng đã thành thực mới có khả năng tham gia vào quá trình tái tổ hợp để hình thành nên hợp tử trong quá trình thụ tinh hay kích hoạt quá trình tái cấu trúc của nhân trong quá trình nhân bản. Như vậy, quá trình nuôi trưởng thành trứng đóng vai trò quan trọng, cung cấp nguồn nguyên liệu cho các nghiên cứu công nghệ sinh sản nâng cao.

Tế bào trứng lợn được thu từ các nang trứng có kích thước từ 3-6mm trên bề mặt buồng trứng. Tế bào trứng sau thu được phân loại chất lượng, chỉ có tế bào trứng có nguyên sinh chất đồng đều tối màu được bao bọc bởi ít nhất hai lớp tế bào cumulus nguyên vẹn trở lên mới được đưa vào sử dụng. Môi trường nuôi thành thực là yếu tố quan trọng ảnh hưởng tới khả năng thành thực cũng như sự phát triển tiếp theo của tế bào trứng lợn sau thụ tinh ống nghiệm (Wang, 1997; Margot & Charles, 2001). Đã có nhiều loại môi trường được sử dụng thành công trong nuôi thành thực tế bào trứng lợn (Hatirnaz & cs., 2018; Yuan Y. & Krisher R. L., 2011). Nhằm lựa chọn môi trường nuôi trứng phù hợp, qua đó nâng cao hiệu quả nuôi trưởng thành *in vitro* đối với trứng lợn, chúng tôi đã tiến hành so sánh hai môi trường nuôi trứng là TCM199 và môi trường POM. Kết quả được thể hiện trong bảng 1.

Tỷ lệ trứng thành thực khi nuôi trong môi trường POM là $73,45 \pm 2,61\%$ ($P < 0,05$) cao hơn so với tỷ lệ này ở trứng nuôi trong môi trường TCM199 ($58,84 \pm 2,49\%$). Tuy nhiên, không có sự khác biệt giữa tỷ lệ tế bào trứng vượt qua giai đoạn túi mầm (GVBD) khi nuôi cấy trong hai môi trường kể trên. Kết quả cho thấy môi trường POM làm tăng đáng kể tỷ lệ trứng thành thực so với môi trường TCM199. Vì vậy, chúng tôi chọn môi trường POM là môi trường nuôi thành thực trứng trong các thí nghiệm tiếp theo.

Bảng 1. Tỷ lệ thành thực của trứng lợn nuôi trưởng thành trong môi trường POM và TCM199

Môi trường nuôi trứng	Tổng số tế bào trứng	Số tế bào trứng chín (tỷ lệ thành thực (%))
TCM199	102	60 (58,84 ^a ± 2,49)
POM	110	81 (73,45 ^b ± 2,61)

Ghi chú: Số lần nhắc lại thí nghiệm $n = 4$; Trong cùng một cột, các chữ cái khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê $P < 0,05$.

Bảng 2. Kết quả đánh giá ảnh hưởng nguồn nước pha môi trường nuôi thành thực trứng lợn *in vitro*

Nguồn nước pha Môi trường POM	Tổng số tế bào trứng	Số tế bào trứng chín (tỷ lệ thành thực (%))
Nước Sigma	125	110 (87,16 ± 4,74)
Nước MQW	128	106 (83,20 ± 6,93)

Ghi chú: Số lần nhắc lại thí nghiệm $n = 4$.

3.2. Ảnh hưởng của nguồn nước pha môi trường nuôi trưởng thành tới sự thành thực của tế bào trứng lợn nuôi *in vitro*

Môi trường POM (Yoshioka & cs., 2008) được pha trên nguồn nước Sigma. Tuy nhiên, ngoài giá thành cao thì ở Việt Nam chưa có bán loại nước này trên thị trường rộng rãi. Đây là một hạn chế với các phòng thí nghiệm Công nghệ phôi của Khoa Thú y cũng như các phòng thí nghiệm phôi động vật ở Việt Nam. Vì vậy, nhằm tiết kiệm chi phí chúng tôi thử nghiệm sử dụng nguồn nước MQW để pha môi trường nuôi thành thực trứng lợn và tiến hành so sánh hiệu quả nuôi thành thực trứng từ hai nguồn nước pha môi trường nuôi trứng POM là nước Sigma và nước MQW. Kết quả được thể hiện ở bảng 2.

Trong môi trường POM pha từ nguồn nước Sigma số trứng thành thực là 110 trứng trên tổng số 125 trứng đạt tỷ lệ thành thực là 87,16 ± 4,74% không có sự khác biệt đáng kể với tỷ lệ thành thực của trứng nuôi trong môi trường POM sử dụng nguồn nước MQW 83,20 ± 6,93% với số trứng thành thực là 106 trứng trên tổng số 128 trứng. Đồng thời, cũng không có sự khác biệt giữa tỷ lệ tế bào trứng vượt qua giai đoạn túi mầm (GVBD) khi nuôi cấy trong hai môi trường kể trên (96,11% và 93,86%).

Kết quả cho thấy không có sự khác biệt về nguồn nước pha môi trường POM. Vì vậy, nước MQW thay thế cho nước Sigma trong các nghiên cứu chuyên sâu và có thể tiết kiệm chi phí nghiên cứu. Từ kết quả này, trong thí nghiệm 2, chúng tôi lựa chọn nước MQW là nguồn nước pha môi trường thành thực POM.

3.3. Ảnh hưởng của việc bổ sung hormone trong môi trường nuôi thành thực trứng lợn

Hormone đóng một vai trò quan trọng trong quá trình trưởng thành của tế bào trứng. Hormone gồm eCG và hCG có nhiệm vụ giúp tế bào trứng phát triển và kích thích tế bào trứng thành thực sẵn sàng cho quá trình thụ tinh. Vì vậy, chúng tôi tiến hành so sánh tỷ lệ thành thực của tế bào trứng trong môi trường POM bổ sung hormone trong 22 giờ đầu hoặc môi trường POM bổ sung hormone trong 46 giờ. Kết quả thể hiện ở bảng 3 cho thấy tỷ lệ thành thực của trứng nuôi thành thực trong môi trường POM bổ sung hormone trong 22 giờ là 90,88 ± 2,33% ($P < 0,05$) cao hơn nhiều so với tỷ lệ thành thực của môi trường POM bổ sung hormone trong 46 giờ 84,93 ± 2,78%. Tuy nhiên, không có sự khác biệt giữa tỷ lệ tế bào trứng vượt qua giai đoạn túi mầm (GVBD) khi nuôi cấy trong hai môi trường kể trên.

Bảng 3. Kết quả đánh giá ảnh hưởng của việc bổ sung hormone trong môi trường nuôi thành thực trứng lợn *in vitro*

Môi trường nuôi thành thực	Tổng số tế bào trứng	Số tế bào trứng chín (tỷ lệ thành thực (%))
Hormone trong 46 giờ	153	131 (84,93 ^a ± 2,78)
Hormone trong 22 giờ đầu	184	168 (90,88 ^b ± 2,33)

Ghi chú: Số lần nhắc lại thí nghiệm n = 4; Trong cùng một cột, các chữ cái khác nhau thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê P < 0,05.

Kết quả cho thấy có sự liên quan giữa tỷ lệ thành thực trứng và thời gian hormone có mặt trong môi trường thành thực trứng. Môi trường nuôi thành thực bổ sung hormone trong 22 giờ đầu tiên nuôi cấy làm tăng đáng kể tỷ lệ thành thực của trứng so với môi trường bổ sung hormone 46 giờ nuôi cấy. Ngoài ra, hormone là hoạt chất có giá thành cao nên sử dụng trong thời gian sau 22 giờ nuôi cấy sẽ gây tốn kém mà tỷ lệ thành thực trứng thấp hơn so với môi trường chỉ dùng hormone trong 22 giờ nuôi cấy đầu tiên. Vì vậy, sử dụng môi trường bổ sung hormone trong 22 giờ đầu tiên nuôi cấy ngoài tăng tỷ lệ thành thực còn tiết kiệm chi phí cho các nghiên cứu.

4. KẾT LUẬN

Cả hai môi trường nuôi thành thực trứng POM và TCM199 đều thành công trong việc nuôi thành thực trứng lợn *in vitro*. Trong đó, POM phù hợp cho các nghiên cứu chuyên sâu, TCM199 phù hợp cho các nghiên cứu nhỏ và thực hành.

Môi trường POM từ 2 nguồn nước pha Sigma và MQW đều cho kết quả thành thực trứng lợn nuôi cấy *in vitro* cao. Vậy có thể sử dụng nước khử ion tự sản xuất tại phòng thí nghiệm là nguồn nước pha môi trường POM.

Môi trường POM bổ sung hormone trong 22 giờ đầu nuôi cấy cho tỷ lệ thành thực cao hơn so với môi trường bổ sung hormone trong 46 giờ nuôi cấy. Từ đó có thể đưa ra kết luận bổ sung hormone trong 22 giờ đầu làm tăng tỷ lệ thành thực trứng lợn nuôi *in vitro* và tiết kiệm chi phí nghiên cứu.

Như vậy, POM là môi trường có hiệu quả cao trong nuôi thành thực trứng lợn *in vitro*, tuy

nhiên giá thành cao hơn so với TCM199 do thành phần môi trường có chứa một số hoá chất có giá thành cao như eGF và dbcAMP. Trong nghiên cứu này, chúng tôi ứng dụng thay đổi nguồn nước pha môi trường từ nước Sigma sang nước khử ion (MQW) sản xuất trong phòng thí nghiệm, đồng thời tối ưu hoá thời gian sử dụng hormone trong vòng 22 giờ đầu nuôi cấy giúp tiết kiệm chi phí, tạo điều kiện phát triển cho các nghiên cứu sử dụng môi trường POM trong nghiên cứu.

LỜI CẢM ƠN

Chúng tôi chân thành cảm ơn dự án JICA-SATREPS “Thành lập ngân hàng gen đông lạnh cho các giống lợn bản địa Việt Nam và phát triển hệ thống chăn nuôi lợn bền vững bảo vệ đa dạng sinh học” đã tài trợ thiết bị và hoá chất để chúng tôi thực hiện nghiên cứu này.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Critser J.K., Laughlin M.H., Prather R.S. & Riley L.K. (2009). Proceedings of the Conference on Swine in biomedical research. ILAR Journal. 50: 89-94.
- Hatirnaz A., Ata B., Saynur H.E., Dahan M.H., Tannus S., Tan J. & Tan S.L. (2018). Oocyte *in vitro* maturation: A systematic review. Turkish journal of obstetrics and gynecology J2. Turk J Obstet Gynecol. 2: 112-125
- Luo Y., Lin L., Bolund L., Jensen T.G. & Sorensen C.B. (2012). Genetically modified pigs for biomedical research. Inherit Metab Dis. 35: 695-713.
- Margot Alves Nunes Dode & Charles Graves (2001). Influence of hormones and follicular fluid on maturation of pig oocytes. Ciênca Rural, Santa Maria. 31(1): 99-104.
- DengKe Pan 1, Li Zhang, YanRong Zhou, Chong Feng, Chuan Long, Xiao Liu, Rong Wan, Jian Zhang,

- AiXing Lin, EnQiu Dong, ShuChen Wang, HouGang Xu, HongXing Chen (2010). Efficient production of omega-3 fatty acid desaturase (sFat-1)-transgenic pigs by somatic cell nuclear transfer. *Sci China Life Sci.* 53(4): 517-523. doi:10.1007/s11427-010-0080-x
- Prather R.S., Lorson M., Ross J.W., Whyte J.J. & Walters E. (2013). Genetically Engineered Pig Models for Human Diseases. *Annu. Rev. Anim. Biosci.* 1: 203-219.
- Ramsoondar J., Vaught T., Ball S., Mendicino M., Monahan J., Jobst P. & Ayares D. (2009). Production of transgenic pigs that express porcine endogenous retrovirus interfering RNAs. *Xenotransplantation.* 16: 164-180. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3089.2009.00525>.
- Takahagi Y., Fujimura T., Miyagawa S., Nagashima H., Shigehisa T., Shirakura R. & Murakami H. (2005). Production of alpha 1,3-galactosyltransferase gene knockout pigs expressing both human decay-accelerating factor and N-acetylglucosaminyltransferase III. *Molecular Reproduction and Development.* 71: 331-338.
- Tanihara F., Takemoto T., Kitagawa E., Rao S., Do L. T., Onishi A. & Otoi T. (2016). Somatic cell reprogramming-free generation of genetically modified pigs. *Science Advances.* 2: e1600803. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1600803>.
- Wang W.H., Abeydeera L.R., Cantley T.C. & Day B.N. (1997). Effects of Oocyte maturation media on development of pig embryos produced by *in vitro* fertilization. *Journal of Reproduction and Fertility.* 111 : 101-108.
- Yoshioka K., Suzuki C. & Onishi A. (2008). Defined System for *In Vitro* Production of Porcine Embryos Using a Single Basic Medium. *Journal of Reproduction and Development.* 54: 208-213.
- Yuan Y. & Krisher R.L. (2011). *In vitro* maturation (IVM) of porcine oocytes. *Methods Mol Biol.* 825: 183-98.