

## NHỮNG YẾU TỐ ẢNH HƯỞNG ĐẾN HIỆU QUẢ ĐÔNG LẠNH NHANH PHÔI BÒ *IN VITRO*

Nguyễn Thị Ngọc Anh, Nguyễn Đức Trường,  
Nguyễn Thị Thu Trang, Nguyễn Văn Thành, Đỗ Thị Kim Lành\*

Khoa Thú y, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

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

Ngày nhận bài: 17.04.2023

Ngày chấp nhận đăng: 29.08.2023

### TÓM TẮT

Nghiên cứu được thực hiện nhằm nâng cao hiệu quả đông lạnh nhanh phôi bò trong ống nghiệm. Tế bào trứng bò được nuôi thành thực và thụ tinh trong ống nghiệm ở nồng độ 1, 2 hoặc  $5 \times 10^6$  tinh trùng/ml trong 6 giờ. Sau đó, các phôi nang được đông lạnh nhanh trong môi trường sử dụng TCM199 + BSA (Tissue culture medium-199 + Bovine serum albumin) hoặc DPBS + FBS (Dulbecco's phosphate-buffered saline + Fetal bovine serum). Không có sự khác biệt đáng kể về tỉ 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 tỉ lệ thụ tinh và tỉ lệ phôi nang cao nhất. Đông lạnh và giải đông phôi bò trong môi trường đông lạnh nhanh DPBS + FBS và TCM199 + BSA cho tỉ lệ phôi sống sau giải đông lần lượt là 92,96% và 82,71%, tuy nhiên không có sự khác biệt thống kê về tỉ lệ này giữa hai môi trường. Tỉ lệ phôi thoát màng sau giải đông của môi trường TCM199 + BSA đạt 54% cao hơn ( $P < 0,05$ ) so với tỉ lệ này ở môi trường DPBS + FBS là 28,8%. Với nhóm phôi chỉnh gene, số lượng phôi sống sau giải đông đạt 96,03% so với 88,82% ở nhóm phôi IVF. Tỉ lệ phôi sống sau giải đông cũng bị ảnh hưởng bởi yếu tố nguồn gốc của tế bào trứng.

Từ khóa: Phôi nang, đông lạnh nhanh, phôi bò *in vitro*.

### Factors Affecting the Efficiency of Rapid Vitrification of *in vitro* Bovine Embryo

#### ABSTRACT

The research was conducted to improve the quality of *in vitro* bovine embryo vitrification. Bovine oocytes were matured then fertilized with frozen-thawed semen at 1, 2 or  $5 \times 10^6$  sperm/ml for 6 hours to find the optimal conditions. The blastocysts were then rapidly frozen in the medium using TCM199 + BSA (Tissue culture medium-199 + Bovine serum albumin) or DPBS + FBS (Dulbecco's phosphate-buffered saline + Fetal bovine serum). There was no significant difference in the maturation rate of oocytes matured in BO-IVM or TCM-199 medium. *In vitro* fertilized bovine oocytes with frozen-thawed sperm at concentration of  $2 \times 10^6$  sperm/ml for 6 hours gave the highest fertilization and blastocyst rate. The survival rate after thawing of bovine embryos frozen in DPBS + FBS and TCM199 + BSA medium was 92.96% and 82.71%, respectively, however, there was no significant difference between the groups. The hatching rate after thawing of embryos vitrified in TCM 199 + BSA medium reached 54%, significantly higher than that of embryos vitrified in DPBS + FBS medium (28.8%). In the gene-edited embryo group, the number of survival embryos after thawing reached 96.03 % compared to 88.82 % in the IVF group. The source of oocytes also affected the survival rate of embryos after thawing.

Keywords: Blastocytes, rapid vitrification, bovine *in vitro* embryos.

#### 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Sự phát triển của công nghệ hỗ trợ sinh sản nói chung và kỹ thuật đông lạnh nói riêng đã đem lại nhiều tiềm năng ứng dụng có ý nghĩa không chỉ về kinh tế mà cả trong nghiên cứu khoa học. Với nhiều ưu điểm nổi bật, đông lạnh

nhạy bằng thủy tinh hoá đã trở thành phương pháp thay thế cho đông lạnh chậm - giải đông nhanh truyền thống. Nhiều quy trình đông lạnh nhanh khác nhau đã được đề xuất nhằm mục đích tối ưu hóa tỉ lệ sống của phôi bào bao gồm phát triển các dụng cụ khác nhau để giảm khối lượng dung dịch thủy tinh hóa và để tăng tốc

quá trình (Vajta & cs., 1998; Siqueira & cs., 2011; Villamil & cs., 2012; Do & cs., 2014). Ngoài ra, thành phần các chất bảo vệ lạnh nội bào như ethylene glycol (EG) và dimethylsulfoxide (DMSO) cũng được thay đổi nhằm tạo ra một hỗn hợp hiệu quả để thâm nhập vào các tế bào và mô (Vajta & cs., 1996, 1998; Yokota & cs., 2000; Rodrigues & cs., 2004a; b; Madeira & cs., 2014).

Ở nước ta trong những năm gần đây, nhiều nghiên cứu được triển khai nhằm nhân nhanh đàn bò để thực hiện “Chiến lược phát triển chăn nuôi đến năm 2020” do Thủ tướng chính phủ đề ra (16/1/2008). Tuy nhiên, các nghiên cứu này còn gặp khó khăn do bò là động vật đơn thai, thời gian mang thai kéo dài, ảnh hưởng đến hiệu quả nhân nhanh và cải tạo giống. Việc ứng dụng công nghệ cấy truyền phôi trên bò là bước tiến quan trọng giúp nhân nhanh đàn bò, đồng thời khai thác được ưu thế di truyền của cả bò đực giống và bò cái giống. Tuy nhiên, hiệu quả cấy truyền phôi phụ thuộc vào sự đồng pha giữa tuổi phôi và giai đoạn động dục của bò nhận. Vì vậy, phôi bò sản xuất ra thường được yêu cầu đông lạnh và bảo quản trong nitơ lỏng để luôn sẵn sàng vào thời điểm cấy phôi thích hợp trên bò nhận phôi. Tuy nhiên, chất lượng phôi bò sau giải đông chưa cao, do đó việc nghiên cứu nâng cao hiệu quả bảo quản phôi bò bằng phương pháp thủy tinh hóa là việc làm cấp thiết. Thủy tinh hóa là quá trình làm lạnh mẫu trứng hoặc phôi với thời gian rất nhanh, trong suốt quá trình hạ nhiệt độ, toàn bộ khối vật chất bên trong và bên ngoài tế bào chuyển thành dạng khối đặc, trong suốt giống như thủy tinh (glass-like). Hiện nay, thủy tinh hóa là phương pháp tối ưu nhất được sử dụng để đông lạnh phôi do tính tiết kiệm về mặt thời gian, không tốn chi phí về mặt thiết bị đồng thời cũng không hình thành tinh thể đá làm tổn thương tế bào như phương pháp đông lạnh chậm (Mogas, 2019).

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, đồng thời so sánh hiệu quả hai môi trường đông lạnh nhanh là TCM199 + BSA và DPBS + FBS qua đó nâng cao hiệu quả đông

lạnh phôi 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 phôi bò nuôi cấy trong ống nghiệm nhằm đánh giá hiệu quả của môi trường nuôi cấy tế bào trứng bò, môi trường thụ tinh và môi trường đông lạnh nhanh phôi bò. Buồng trứng bò được thu từ các lò mổ tại địa bàn huyện Đông Anh - Hà Nội và tỉnh Bắc Ninh. Tinh bò H'Mông đông lạnh của Trung tâm tinh bò giống Moncada, có chất lượng tốt, được sử dụng thụ tinh ống nghiệm với tế bào trứng bò để tạo ra phôi được nuôi trong các môi trường tổng hợp và điều kiện nuôi *in vitro* thích hợp. Sau đó, tiến hành thu phôi nang ngày 7, đông lạnh nhanh và giải đông phôi đánh giá chất lượng phôi sau giải đông.

### 2.2. Phương pháp nghiên cứu

#### 2.2.1. Nghiên cứu ảnh hưởng của môi trường nuôi thành thực trứng đến tỉ lệ thành thực của trứng bò *in vitro*

Tế bào trứng loại A và B thu được có 2 đến 4 lớp tế bào cận noãn (cumulus) bao quanh trứng, các lớp tế bào cận noãn này dày, đều đặn, đồng nhất và liên kết chặt chẽ với nhau, nguyên sinh chất của trứng đồng đều, toàn bộ trứng nhìn trong và đầy đặn, được nuôi trong môi trường TCM199 hoặc môi trường BO-IVM. Khoảng 50 tế bào trứng loại A và B được nuôi trong 500ul môi trường nuôi trứng bao gồm TCM19 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-Kyoritsuseiyaku Co., Tokyo, Japan), 5% huyết thanh bê (FBS; Invitrogen) và 50 µg/ml gentamicin (Sigma-Aldrich) hoặc trong môi trường BO-IVM trong 22 giờ, nuôi trong đĩa 4 giếng (Nunc A/S, Roskilde, Denmark). 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 màng tế bào cận noãn (tế bào cumulus) sử dụng dung dịch Hyaluronidaza

(150IU) và tác động cơ học sử dụng 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 độ phóng đại 40 lần.

### 2.2.2. Nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ tinh trùng đến tỉ lệ thụ tinh của trứng bò sau IVM (*in vitro maturation*) và khả năng phát triển của phôi bò sau IVF (*in vitro fertilized*)

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 6 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 tỉ 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.

### 2.2.3. Đông lạnh phôi bò bằng phương pháp thuỷ tinh hoá, đánh giá hiệu quả môi trường đông lạnh nhanh

Phôi bò sau khi phát triển đến giai đoạn phôi nang sớm sẽ được tiến hành đông lạnh phôi bằng phương pháp làm lạnh nhanh (phương pháp thuỷ tinh hoá). Môi trường đông lạnh nhanh là DPBS + FBS hoặc TCM199 + BSA.

## 2.3. Xử lý số liệu

Các chỉ tiêu đánh giá bao gồm tỉ lệ tế bào trứng phát triển đến giai đoạn đầu của giảm phân II (tỉ lệ thành thực), tỉ lệ phân chia, tỉ lệ hình thành phôi nang, tỉ lệ phôi sống sau giải đông, tỉ lệ phôi sống thoát màng sau giải đông. Số liệu là tỷ lệ phần trăm được chuyển đổi bằng hàm *arcsin* trước khi phân tích phương sai (one way ANOVA) hoặc T-test (khi phân tích theo cặp đôi). Đối với trường hợp phép thử one way

ANOVA cho kết quả so sánh có ý nghĩa thống kê ( $P < 0,05$ ) thì phương pháp least significant difference (LSD) được sử dụng để so sánh kết quả theo từng cặp. Các so sánh được thực hiện trên phần mềm SAS dành cho Windows phiên bản 9.1.

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 thành thực trứng đến tỉ lệ thành thực của trứng bò *in vitro*

Trứng có chất lượng loại A và B được đưa vào nuôi trong môi trường BO-IVM và TCM199. Quá trình nuôi thành thực diễn ra trong thời gian 22 giờ ở nhiệt độ 38,5°C; 5% CO<sub>2</sub>. Sau thời gian trên, trứng được đánh giá sự thành thực thông qua phương pháp nhuộm nhân bằng thuốc nhuộm orcein. Kết quả được trình bày tại bảng 1.

Kết quả bảng 1 cho thấy, trong môi trường BO-IVM, số tế bào trứng thành thực là 104 trứng trên tổng số 120 trứng đạt tỉ lệ  $83,42 \pm 5,67\%$  không có sự khác biệt đáng kể với tỉ lệ thành thực của tế bào trứng nuôi trong môi trường TCM199 ( $78,85 \pm 3,78\%$ ). Đồng thời cũng không có sự khác biệt giữa tỉ lệ tế bào trứng vượt qua giai đoạn túi mầm (GVBD) khi nuôi trong hai môi trường kể trên (98,8% và 97,65%). Kết quả này thấp hơn so với Nguyễn Thị Hương & cs. (2015). Sự khác nhau là do nguồn gốc tế bào trứng. Trong nghiên cứu này, chúng tôi tiến hành thu các tế bào trứng bò từ buồng trứng thu tại lò mổ, trong khi đó tác giả sử dụng tế bào trứng thu từ bò sống bằng phương pháp siêu âm hút trứng. Buồng trứng bò thu tại lò mổ cho chất lượng tế bào trứng kém hơn tế bào trứng thu từ bò sống.

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

Môi trường	Số trứng	GVBD (trứng)	Tỷ lệ GVBD (%)	Số trứng thành thực	Tỷ lệ trứng thành thực (%)
TCM199	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 (SE); Số lần nhắc lại thí nghiệm  $n = 5$ .

**Bảng 2. Ảnh hưởng của nồng độ tinh trùng đến tỉ lệ phôi phân chia và số lượng phôi nang (ngày thứ 7)**

Nồng độ tinh (triệu/ml)	Số trứng (n)	Số phôi phân chia	Tỷ lệ phôi phân chia (%)	Số phôi nang	Tỷ lệ phôi nang (%)
1	216	88	41,83 <sup>a</sup> ± 6,31	24	11,26 <sup>c</sup> ± 1,85
2	203	142	69,87 <sup>b</sup> ± 4,07	59	29,1 <sup>d</sup> ± 4,11
5	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 (SE); Số lần nhắc lại thí nghiệm là 5-6 lần; Trong cùng một cột, các chữ cái khác nhau <sup>a, b</sup> và <sup>c, d</sup> thể hiện sự khác biệt có ý nghĩa thống kê  $P < 0,05$ .

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 TCM199 làm môi trường nuôi thành thực trứng bò trong các thí nghiệm tiếp theo.

### 3.2. Ảnh hưởng của nồng độ tinh trùng đến tỉ lệ phôi phân chia và khả năng phát triển của phôi bò sau IVF

Tinh bò H'Mông đông lạnh được giải đông trong nước ấm 37°C trong 1 phút. Sau đó, loại bỏ các môi trường đã sử dụng để bảo quản tinh trùng bằng cách ly tâm và pha loãng tinh trùng với nồng độ thích hợp. Trong thí nghiệm này, tinh trùng trong môi trường thụ tinh được sử dụng ở các nồng độ khác nhau:  $1 \times 10^6$ /ml,  $2 \times 10^6$ /ml hoặc  $5 \times 10^6$ /ml. Quá trình thụ tinh được thực hiện trong 6 giờ ở 38,5°C; 5% CO<sub>2</sub>, độ ẩm không khí bão hòa. Kết quả được trình bày ở bảng 2.

Nồng độ tinh trùng có ảnh hưởng đáng kể 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 tỉ lệ tế bào trứng được thụ tinh cao nhưng tỉ lệ đa thụ tinh 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. 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 trong bảng 2 cho thấy, nồng độ tinh  $2 \times 10^6$

cho tỉ lệ phôi phân chia và tỉ 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% ( $P \leq 0,05$ ); tỉ lệ phôi nang đạt 29,1% so với 11,26% và 20,53% ( $P \leq 0,05$ ).

### 3.3. Kết quả đông lạnh phôi bò bằng phương pháp thủy tinh hóa

#### 3.3.1. Đông lạnh nhanh phôi bò bằng môi trường DPBS + FBS hoặc TCM 199 + BSA

Đánh giá ảnh hưởng của môi trường đông lạnh đến tỉ lệ phôi nang sống sau giải đông cho thấy, không có sự khác biệt thống kê về tỉ lệ này giữa hai nhóm phôi được đông lạnh trong môi trường DPBS + FBS hoặc TCM199 + BSA. Tuy nhiên, chất lượng phôi sau giải đông giữa hai nhóm môi trường có sự chênh lệch đáng kể. Với các phôi nang được đông lạnh trong môi trường DPBS + FBS, khi giải đông cho số lượng phôi nang thoát màng là 85 trên tổng số 332 phôi sống, đạt tỉ lệ 28,8%. Tỉ lệ này tăng lên đáng kể khi phôi được đông lạnh trong môi trường TCM199 + BSA với 25/39 phôi thoát màng và đạt 54% ( $P < 0,05$ ). Những tổn thương do quá trình đông lạnh đến tế bào trứng có thể xảy ra ở tất cả các công đoạn như hạ nhiệt, làm mát, đông lạnh, rã đông và làm ấm. Trong quá trình làm lạnh, tổn thương tế bào do lạnh xảy ra ở 15 đến -5°C, sự hình thành tinh thể băng nội bào xảy ra ở -5 đến -80°C và tổn thương đứt gãy đối với màng zona pellucida (ZP) và tế bào chất xảy ra ở -15 đến -50°C (Vajta & Nagy, 2006). Trong giai đoạn rã đông và làm ấm, nhiễm độc các chống lạnh và tổn thương thẩm thấu thường xảy ra đối với tế bào trứng.

**Bảng 3. Khả năng phát triển của phôi bò sau giải đông**

Môi trường	Số phôi	Số phôi sống sau giải đông	Tỷ lệ phôi sống sau giải đông (%)	Số phôi thoát màng	Tỷ lệ phôi thoát màng (%)
DPBS + FBS	367	332	92,96 ± 1,38	85	28,8 <sup>a</sup> ± 3,2
TCM199 + BSA	45	39	82,71 ± 6,74	25	54 <sup>b</sup> ± 13,25

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

**Bảng 4. Tỷ lệ phôi sống sau giải đông theo nhóm phôi**

Nhóm phôi	Số phôi	Số phôi sống sau giải đông	Tỷ lệ phôi sống sau giải đông (%)	Số phôi thoát màng	Tỷ lệ phôi thoát màng (%)
Phôi chỉnh sửa gene	180	170	96,03 <sup>a</sup> ± 1,55	50	32,9 ± 4,75
Phôi IVF	232	201	88,82 <sup>b</sup> ± 2,14	60	28,27 ± 4,19

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

**Bảng 5. Ảnh hưởng của nguồn gốc tế bào trứng đến khả năng sống sót của phôi sau giải đông**

Nguồn gốc	Số phôi	Số phôi sống sau giải đông	Tỷ lệ phôi sống sau giải đông (%)	Số phôi thoát màng	Tỷ lệ phôi thoát màng (%)
Bò H'Mông	222	211	96,07 <sup>a</sup> ± 1,42	74	34,56 ± 4,35
Bò sữa	149	129	89,2 <sup>b</sup> ± 2,59	31	26,72 ± 4,9
Bò Úc	41	31	79,54 <sup>b</sup> ± 5,73	5	18,89 ± 11,6

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

Số lượng phôi nang bò sống và thoát màng sau giải đông ảnh hưởng trực tiếp đến hiệu quả cấy truyền phôi trên bò. Từ kết quả của thí nghiệm trên, chúng tôi lựa chọn môi trường TCM199 + BSA làm môi trường đông lạnh phôi cho các thí nghiệm chuyên sâu trên bò.

Số lượng phôi nang bò sống và thoát màng sau giải đông ảnh hưởng trực tiếp đến hiệu quả cấy truyền phôi trên bò. Từ kết quả của thí nghiệm trên, chúng tôi lựa chọn môi trường TCM199 + BSA làm môi trường đông lạnh phôi cho các thí nghiệm chuyên sâu trên bò.

### 3.3.2. Giải đông phôi và đánh giá tỉ lệ phôi sống sót sau đông lạnh, giải đông

Xung điện tế bào là một phương pháp phân phối vật lý phổ biến. Nó áp dụng các xung của

dòng điện để kích thích sự mở tạm thời của các lỗ trên màng tế bào, cho phép vận chuyển phức hợp gen vào tế bào. Trên bò, hiệu quả chuyển gen chỉ đạt khoảng 3% trong khi đó, tỉ lệ phát triển thành con từ giai đoạn phôi nang chỉ đạt 18% (West & Gill, 2016). Mục đích của thí nghiệm để đánh giá ảnh hưởng của quá trình xung điện chỉnh sửa gen đến khả năng hồi phục của phôi sau đông lạnh. Từ bảng 4 cho thấy, tỉ lệ phôi nang thoát màng của nhóm phôi IVF thấp hơn, có 60 phôi nang thoát màng trên tổng số 201 phôi sống sau giải đông, chiếm 28,27% so với 32,9% các phôi nang nằm trong nhóm có chỉnh sửa gene. Tỷ lệ phôi sống sau giải đông của nhóm phôi chỉnh sửa gene là 96,03% cao hơn đáng kể so với tỉ lệ này ở nhóm phôi thường là 88,82%. Từ kết quả trên cho thấy tác động

của xung điện chỉnh sửa gen không làm ảnh hưởng đến khả năng sống sót của phôi sau giải đông mà còn làm tăng khả năng thoát màng của phôi sau giải đông.

Bảng 5, chúng tôi thu mẫu buồng trứng của ba giống bò: bò H'Mông, bò sữa và bò Úc. Sau đó, tạo phôi và tiến hành đông lạnh phôi nang. Kết quả thí nghiệm cho thấy, tổng số phôi nghiên cứu của ba giống bò H'Mông, bò sữa và bò Úc lần lượt là 222, 149 và 41, trong đó số phôi nang sống sau giải đông tương ứng 211, 129 và 31. Qua đó, nhận thấy tỉ lệ phôi sống sau giải đông của phôi bò H'Mông đạt 96,07% cao hơn đáng kể so với nhóm bò sữa và bò Úc là 89,2% và 79,54% ( $P < 0,05$ ). Mặc dù, tỉ lệ phôi sống sau giải đông có sự chênh lệch giữa các nhóm bò, tuy nhiên chất lượng phôi sau giải đông không có sự khác biệt có ý nghĩa thống kê. Nhóm bò H'Mông, tỉ lệ phôi thoát màng sau giải đông đạt 74/211 phôi nang sống chiếm 34,56% cao hơn không đáng kể so với nhóm bò sữa và bò Úc (26,72% và 18,89%).

Kết quả của thí nghiệm trên cho thấy nguồn gốc tế bào trứng có ảnh hưởng trực tiếp đến tỉ lệ phôi nang sống sau giải đông.

#### 4. KẾT LUẬN

Đông lạnh và giải đông phôi bò trong môi trường đông lạnh nhanh DPBS + FBS và TCM199 + BSA cho tỉ lệ phôi sống sau giải đông lần lượt là 92,96% và 82,71%, tuy nhiên không có sự khác biệt thống kê về tỉ lệ này giữa hai môi trường. Tỉ lệ phôi sống thoát màng sau giải đông của môi trường TCM199 + BSA đạt 54%, cao hơn đáng kể so với tỉ lệ này ở môi trường DPBS + FBS là 28,8%

Xung điện chỉnh sửa gen không làm ảnh hưởng đến tỉ lệ phôi sống sau giải đông mà còn làm tăng khả năng thoát màng của phôi sau giải đông. Với nhóm phôi chỉnh gene, số lượng phôi sống sau giải đông đạt 170/180 phôi đông lạnh, chiếm 96,03% so với 88,82% ở nhóm phôi thường.

Tỉ lệ phôi sống sau giải đông cũng bị ảnh hưởng bởi yếu tố nguồn gốc của tế bào trứng. Với những tế bào trứng được thu từ bò H'Mông

cho tỉ lệ phôi sống sau giải đông đạt 96,07% cao hơn đáng kể tế bào trứng thu từ nhóm bò sữa và bò Úc (89,2% và 79,54%)

#### LỜI CẢM ƠN

Nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn Học viện Nông nghiệp Việt Nam đã tạo điều kiện hỗ trợ để thực hiện đề tài “Đánh giá hiệu quả đông lạnh nhanh phôi bò sử dụng môi trường TCM199 + BSA và DPBS + FBS”. Mã số đề tài: T2022-09-34.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Asada M., Ishibashi S., Ikumi S. & Fukui Y. (2002). Effect of polyvinyl alcohol (PVA) concentration during vitrification of *in vitro* matured bovine oocytes. *Theriogenology*. 58(6):1199-208. doi: 10.1016/s0093-691x(02)00948-2.
- Chang M.C. (1948). The effects of low temperature on fertilized rabbit ova *in vitro*, and the normal development of ova kept at low temperature for several days. *J Gen Physiol*. 31(5): 385-410.
- Chian R.C., Kuwayama M., Tan L., Tan J., Kato O. & Nagai T. (2004). High survival rate of bovine oocytes matured *in vitro* following vitrification. *Journal of Reproduction and Development*. 50(6): 685-696.
- Do V.H., Walton S. & Taylor-Robinson A.W. (2014). Benefits and constraints of vitrification technologies for cryopreservation of bovine *in vitro* fertilized embryos. *J. Vet. Sci. Anim. Husbandry*. 2: 401.
- Fujihira T., Nagai H. & Fukui Y. (2005). Relationship between equilibration times and the presence of cumulus cells, and effect of Taxol treatment for vitrification of *in vitro* matured porcine oocytes. *Cryobiology* 51(3): 339-343.
- Karja N.W.K. (2008). Nuclear Matureation of Porcine oocytes *in vitro*: Effect of the Cumulus-Oocyte Complexes Quality. *Indoneisan Journal of Biotechnology*. 13(2): 1078-1084.
- Lane M., Schoolcraft WB., Gardner DK., Phil D. (1999). Vitrification of mouse and human blastocysts using a novel cryoloop container-less technique. *Fertility and Sterility*. 72(6): 1073-1078
- Leibfried L. & First N.L. (1979). Characterization of bovine, follicular oocytes and their ability to mature *in vitro*. *J. Anim. Sci*. 48: 76-86
- Leibo S.P. (1980). Water permeability and its activation energy of fertilized and unfertilized mouse ova. *J. Membrain Biol*. 53: 179-188.

- Lilia Kuleshova, Luca Gianaroli, Cristina Magli, Anna Ferraretti & Alan Trounson (1999). Birth following vitrification of a small number of human oocytes: Case Report. *Human Reproduction*. 14(12): 3077-3079.
- Luyet B.J. (1937). The vitrification of organic colloids and of protoplasm. *Biodynamica*. 1(29): 1-14.
- Madeira E.M., Mion B., Silva J.F., Pereira M.M., Campos F.T., Rincón J.A.A., Viegas, D., Vieira A.D., Pegoraro L.M.C. & Lucia Jr. T. (2014). Ethylene glycol monomethyl ether: a potential cryoprotectant for vitrification of bovine embryos produced *in vitro*. *Anim. Reprod.* 11: 486.
- Martino N. Songsasen & Leibo S.P. (1996). Development into Blastocysts of Bovine Oocytes Cryopreserved by Ultra-Rapid Cooling. *Biology of Reproduction*. 54: 1059-1069.
- Martins R.D., Costa E.P., Chagas J.S.C., Ignácio F.S., Torres C.A.A. & McManus C. (2005). Effects of vitrification of immature bovine oocytes on *in vitro* maturation. *Anim. Reprod.* 2(2): 128-134.
- Massip P., Van der Zwalm, Ectors F., De Coster R., D'Ieteren G. & Hanzen C. (1979). Deep freezing of cattle embryos in glass ampules or French straws. *Theriogenology*. 12(2):79-84. doi: 10.1016/0093-691x(79)90012-8.
- Men H., R.L. Monson, Rutledge R.L. (2002). Effect of meiotic stages and maturation protocols on bovine oocyte's resistance to cryopreservation. *Theriogenology*. 57(3): 1095-1103.
- Mogas T. (2018). Update on the vitrification of bovine oocytes and *in vitro* - produced embryos. *Reproduction, Fertility and Development*. 31(1):105-117. doi.org/10.1071/RD18345.
- 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.
- Morató Roser, Dolores Izquierdo, Maria Teresa Paramio & Teresa Mogas (2008). Cryotops versus open-pulled straws (OPS) as carriers for the cryopreservation of bovine oocytes: effects on spindle and chromosome configuration and embryo development. *Cryobiology*. 57(2): 137-141.
- Mukesh Kumar Gupta, Sang Jun Uhm & Hoon Taek Lee (2007). Cryopreservation of immature and *in vitro* matured porcine oocytes by solid surface vitrification. *Theriogenology*. 67: 238-248.
- Nakagata N. (1989). High survival rate of unfertilized mouse oocytes after vitrification. *Journals of reproduction & Fertility*. 87: 479-483.
- Nguyễn Thị Hương, Quân Xuân Hữu, Nguyễn Khánh Vân, Đỗ Văn Hương, Vũ Thị Thu Hương, Nguyễn Thị Lệ Hương. (2015). Ảnh hưởng của môi trường nuôi trứng, nuôi phôi lên sự hình thành và phát triển phôi bò sữa cao sản. *Tạp Chí Khoa học Và Công nghệ Việt Nam*. 57(9).
- Nguyễn Thị Thương Huyền (2008). Thu nhận trứng bò, heo để cải thiện quy trình đông lạnh trứng trong điều kiện Việt Nam. Báo cáo Tổng kết Đề tài Nghiên cứu Khoa học cấp trường Khoa Sinh học, Đại học Sư phạm thành phố Hồ Chí Minh.
- Otoi T., Yamamoto K., Koyama N., Tachikawa S. & Suzuki T. (1998). Cryopreservation of Mature Bovine Oocytes by Vitrification in Straws. *Cryobiology*. 37: 77-85.
- Parkening T.A., Tsunoda Y. & Chang M.C. (1976). Effects of various low temperatures, cryoprotective agents and cooling rates on the survival, fertilizability and development of frozen-thawed mouse eggs. *Journal of Experimental Zoology*. 197(3): 369-374.
- Polge C., Smith A.U. & Parker A.S. (1949). Revival of Spermatozoa after Vitrification and Dehydration at Low Temperatures. *Nature*. 164(4172): 666.
- Rall W.F. & Fahy G.M. (1985). Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. *Nature*. 313(6003): 573-575.
- Rodrigues A.P., Amorim C.A., Costa S.H., Matos M.H., Santos R.R., Lucci C.M., Báo S.N., Ohashi O.M. & Figueiredo J.R. (2004a). Cryopreservation of caprine ovarian tissue using dimethylsulfoxide and propanediol. *Anim. Reprod. Sci.* 84: 211-27.
- Rodrigues A.P., Amorim C.A., Costa S.H., Matos M.H., Santos R.R., Lucci C.M., Báo S.N., Ohashi O.M. & Figueiredo J.R. (2004b). Cryopreservation of caprine ovarian tissue using glycerol and ethylene glycol. *Theriogenology*. 61: 1009-24.
- Shaw J.M., Diotallevi L. & Trounson A.O. (1991). A simple rapid 4.5 M dimethyl-sulfoxide freezing technique for the cryopreservation of one-cell to blastocyst stage preimplantation mouse embryos. *Reproduction, Fertility and Development*. 3(5): 621-626.
- Siqueira Filho E., Caixeta E.S., Pribenszky C., Molnar M., Horvath A., Harnos A., Franco M.M. & Rump R. (2011). Vitrification of bovine blastocysts pretreated with sublethal hydrostatic pressure stress: evaluation of postthaw *in vitro* development and gene expression. *Reprod. Fertil. Dev.* 23: 585-90.
- Smith A. (1952). Behaviour of Fertilized Rabbit Eggs exposed to Glycerol and to Low Temperatures. *Nature*. 170: 374-375.
- Tamás Somfai, András Dinnyés, Dagmar Sage, Miklós Marosán, Joseph W. Carnwath, Manabu Ozawa, Kazuhiro Kikuchi & Heiner Niemann (2006). Development to the blastocyst stage of parthenogenetically activated *in vitro* matured

- porcine oocytes after solid surface vitrification (SSV). *Theriogenology*. 66(2): 415-422.
- Thủ tướng Chính phủ (2008). Quyết định số: 10/2008/QĐ-TTg Về việc Phê duyệt chiến lược phát triển chăn nuôi đến năm 2020 Truy cập từ <https://thuvienphapluat.vn/van-ban/Linh-vuc-khac/Quyết-dinh-10-2008-QĐ-TTg-phe-duyet-chien-luoc-phat-trien-chan-nuoi-den-nam-2020-61874.aspx> ngày 31/03/2023.
- Trounson O., Shea B.F., Ollis G.W. & Jacobson M.E. (1978). Frozen Storage and Transfer of Bovine Embryos. *Journal of Animal Science*. 47(3): 677-681.
- Vajta G., Holm P., Greve T. & Callesen H. (1996). Factors affecting survival rates of *in vitro* produced bovine embryos after vitrification and direct in-straw rehydration. *Anim. Reprod. Sci.* 45:191-200.
- Vajta G., Holm P., Kuwayama M., Booth P.J., Jacobsen H., Greve T. & Callesen H. (1998). Open pulled straw (OPS) vitrification: a new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. *Mol. Reprod. Dev.* 51: 53-8
- Villamil P.R., Lozano D., Oviedo J.M., Ongaratto F.L. & Bó G.A. (2012). Developmental rates of *in vivo* and *in vitro* produced bovine embryos cryopreserved in ethylene glycol based solutions by slow freezing or solid surface vitrification. *Anim. Reprod.* 9: 86-92.
- 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.
- West J. & Gill W.W. (2016). Genome Editing in Large Animals LA -eng. *Journal of equine veterinary science*. 41 AN -27766006. pp. 1-6.
- Willadsen S.M. (1977). Factors affecting the survival of sheep embryos during deep - freezing and thawing. *The Freezing of Mammalian Embryos*.
- Wurth Y.A. & Kruip ThAM (1992). Bovine embryo production *in vitro* after selection of the follicles and oocytes. 12<sup>th</sup> International Congress on Animal Reproduction. The Hague. The Netherlands, August 23-27. I: 387-389.
- Yokota Y., Sato S., Yokota M., Ishikawa Y., Makita M., Asada, T. & Araki Y. (2000). Successful pregnancy following blastocyst vitrification: case report. *Hum. Reprod.* 15: 1802-3.
- Yunus Cetin & Ayhan Bastan (2006). Cryopreservation of immature bovine oocytes by vitrification in straws. *Animal Reproduction Science*. 92: 29-36.