SỬ DỤNG TINH PHÂN TÁCH (SORTED SEMEN) ĐỂ TẠO PHÔI BÒ SỮA *IN VITRO* XÁC ĐỊNH TRƯỚC GIỚI TÍNH

Chung Anh Dũng[1], Phạm Văn Phúc[2],
Nguyễn Chí Hiếu[2], Hồ Quế Anh[2],
Nguyễn Đắc Thành[2]

ABSTRACT

Using sorted semen to create pre - determination *in vitro* female dairy embryos

The main constraint of dairy cattle in Ho Chi Minh city and surrounding areas is low reproduction. So, application of assisted reproductive technologies (ART) is necessary for improving reproduction of dairy cattle and increasing rapidly lactating herd. The research has been conducted in order to experiment some new ART methods, such as ovum pick - up by ultrasound system, separating X - sperm by Fluorescent - Activated Cell Sorting, *in vitro* bovine embryo production from different sources ofgete and female dairy calf production from these embryos. Results showed that OPU can be conducted once per two weeks by using hormone therapies of FSH or PMSG, but efficiency still is low only 1.63 oocytes/ovary/time; X - sperms from FACS are low quality with 35 - 45% sperm vitality and high percentage of abnormality with 74 - 89%; Oocytes from OPU is better than from slaughter - house and they can be used to create *in vitro* female dairy embryos when fertilizing with imported X - sperm.

Key words: Ovum pick - up, Fluorescent - activated cell sorting, *in vitro* embryo production.

I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Công nghệ sinh sản trên gia súc đã và đang được áp dụng ngày càng phổ biến trên thế giới, đặc biệt là trên bò sữa, vì khả năng sinh sản ít với khoảng 3 - 4 bê trong cả cuộc đời, và thường sinh sản kém hơn khi năng suất sữa tăng cao. Chăn nuôi bò sữa ở Việt Nam đang được khuyến khích phát triển mạnh, hiện có khoảng 227 ngàn con với 125 ngàn bò vắt sữa (10/2014) và được quy hoạch phát triển lên 300 ngàn con vào năm 2020. Sinh sản của bò sữa hiện đang gặp nhiều vấn đề khó khăn với tuổi phối giống lần đầu cao, biến động lớn (16 - 36 tháng), khoảng cách giữa 2 lứa đẻ kéo dài (14 - 18 tháng), hệ số phối đậu cao (2,5 - 3,0 phối giống/thụ thai) và nhiều bệnh sinh sản. Vì vậy, để góp phần giải quyết tình trạng sinh sản kém của đàn bò sữa, việc áp dụng những kỹ thuật sinh sản mới như công nghệ cấy truyền phôi, tinh phân tách... là cần thiết, nhằm giúp tăng nhanh đàn bò cái, đảm bảo đạt số lượng 300 ngàn con vào năm 2020. Xuất phát từ những vấn đề nêu trên, đề tài "Sử dụng tinh phân tách (Sorted Semen) để tạo phôi bò sữa *in vitro* xác định trước giới tính" nhằm mục tiêu: Thử nghiệm một số kỹ thuật mới như hút trứng trên buồng trứng của bò cái (OPU), phân tách tinh trùng để tạo phôi bò *in vitro* xác định trước giới tính và có tiềm năng sản xuất sữa cao; Thử nghiệm tạo ra phôi bò, bê cái giống hướng sữa có tiềm năng sản xuất

[1] Viện Khoa học Kỹ thuật Nông nghiệp miền Nam
[2] Trường Đại học Khoa học Tự nhiên TPHCM

cao để cung cấp thêm kỹ thuật sản xuất giống bò, góp phần xây dựng đàn bò giống của các trung tâm sản xuất giống bò sữa tại TP Hồ Chí Minh.

II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

1. Vật liệu nghiên cứu

- Nguồn trứng: Lấy từ buồng trứng ở lò mổ (lô đối chứng) và lấy từ kỹ thuật OPU (lô thí nghiệm). Tinh bò sử dụng: Tinh bò đông lạnh đã phân tách ngoại nhập (dòng tinh Cogent Determined, Anh), năng suất sữa 11.390 lít/con/chu kỳ, tinh bò phân tách trong thí nghiệm này chưa được sử dụng do chất lượng chưa ổn định.

- Thời gian và địa điểm: Từ tháng 04/2012 đến 06/2015 tại các trại bò sữa ở huyện Củ Chi và phòng thí nghiệm mô phôi động vật của Viện KHKT Nông nghiệp miền Nam.

2. Phương pháp nghiên cứu

- Kỹ thuật OPU được thực hiện bằng hệ thống siêu âm cho gia súc HSV2000 của Honda Electronic với đầu dò chuyên dụng chọc hút trứng trên bò HCV - 4710MV, áp dụng quy trình OPU chuyên biệt. Đồng thời thử nghiệm các quy trình sử dụng hormone FSH và PMSG (hay HTNC) để kích thích nhiều nang noãn phát triển trước khi thực hiện OPU. Ngoài ra cũng thử nghiệm 2 tần suất thực hiện OPU là 1 lần/1 tuần và 1 lần/2 tuần không xử lý trước với hormone. Kỹ thuật này được thực hiện bởi các cán bộ Phòng Công nghệ sinh học tại trại dân ở Củ Chi.

- Kỹ thuật phân tách tinh trùng bằng phương pháp FACS nhằm thiết lập quy trình phân tách tinh trùng X từ tinh bò đông lạnh trên hệ thống tách tế bào Cell Sorter BD FACSJazz. Kỹ thuật này được thực hiện bởi các cán bộ Phòng thí nghiệm tế bào gốc tại trường Đại học Khoa học Tự nhiên. Trước và sau phân tách, tinh trùng được kiểm tra các chỉ tiêu chất lượng: tỷ lệ sống, tỷ lệ di động, tỷ lệ kỳ hình.

- Kỹ thuật tạo phôi bò *in vitro* xác định trước giới tính được thực hiện theo quy trình hướng dẫn của Hiệp hội Kỹ thuật Gia súc Nhật (Japan Livestock Technology Association) đã được tối ưu hóa theo điều kiện của phòng Công nghệ sinh học, Viện KHKT Nông nghiệp miền Nam.

- Kỹ thuật cấy truyền phôi thực hiện theo quy trình của Hiệp hội Kỹ thuật Gia súc Nhật (Japan Livestock Technology Association) có cải biên.

III. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

1. Kết quả thử nghiệm kỹ thuật chọc hút trứng OPU

Bảng 1. Kết quả thử nghiệm OPU với 2 tần suất thực hiện

TT	Các chỉ tiêu theo dõi	Tần suất thực hiện OPU		Tổng
		1 lần/1 tuần	1 lần/2 tuần	
1	Số buồng trứng thực hiện	12	12	24
2	Số nang noãn/buồng trứng	2,75	3,00	2,88
3	Số trứng hút được/buồng trứng	1,50	1,58	1,54
4	Tỷ lệ thực hiện OPU/buồng trứng (%)	54,55	52,78	53,62
5	Tỷ lệ trứng chín (%)	72,19	68,41	70,25
6	Tỷ lệ thụ tinh (%)	61,57	53,85	57,71
7	Tỷ lệ phôi dâu, nang (%)	25,00	28,57	26,67

Kết quả bảng trên cho thấy, mặc dù đã thành công với việc sử dụng hệ thống siêu âm chuyên biệt (HSV2000) để hút trứng trong nang noãn trên buồng trứng của bò cái sống, nhưng hiệu quả chưa cao, mới đạt 1,54 trứng/BT/OPU, và không có sai khác giữa 2 tần suất thực hiện OPU (1,50 trứng/BT so với 1,58 trứng/BT) (P>0,05). Điều này là do số lượng nang noãn đạt kích thước để thực hiện OPU (≥5mm) ở hai tần suất thực hiện là tương đương nhau (2,75 trứng/BT so với 3,00 trứng/BT), và tỷ lệ thực hiện thành công OPU cũng tương đương nhau (54,55% so với 52,78%) (P>0,05). Các chỉ tiêu theo dõi khác như tỷ lệ trứng chín (72,19% so với 68,41%), tỷ lệ thụ tinh (61,57% so với 53,85%) và tỷ lệ phôi dâu, phôi nang (25% so với 28,57%) đều không có sự sai khác đáng kể (P>0,05) giữa 2 tần suất thực hiện OPU. Hình ảnh siêu âm các nang noãn trên buồng trứng qua các đợt được thể hiện ở hình ảnh cụ thể.

Kết quả kết hợp sử dụng hormone HTNC và FSH để xử lý trước khi thực hiện OPU được thể hiện trong bảng 2. Kết quả cho thấy dù FSH kích thích, giúp nhiều nang noãn phát triển đạt kích thước ≥5mm để thực hiện OPU (3,42 nang noãn/BT so với 2,75 nang noãn/BT), nhưng do tỷ lệ thực hiện OPU thấp hơn (46,34% so với 51,52%), nên số trứng hút được khi kích thích bằng FSH cao hơn không đáng kể so với kích thích bằng HTNC (1,58 trứng/BT so với 1,42 trứng/BT). Các chỉ tiêu tỷ lệ trứng chín, tỷ lệ thụ tinh và tỷ lệ phôi dâu, phôi nang giữa 2 lô sử dụng HTNC và FSH không sai khác có ý nghĩa thống kê (70,61 - 66,65% và 37,5% so với 68,43% - 59,99% và 28,75%, tương ứng).

Bảng 2. Kết quả thử nghiệm OPU kết hợp với xử lý trước bằng hormone

TT	Các chỉ tiêu theo dõi	Hormone sử dụng		Tổng
		HTNC	FSH	
1	Số buồng trứng thực hiện	12	12	24
2	Số nang noãn/buồng trứng	2,75	3,42	3,08
3	Số trứng hút được/buồng trứng	1,42	1,58	1,50
4	Tỷ lệ thực hiện OPU/buồng trứng (%)	51,52	46,34	48,65
5	Tỷ lệ trứng chín (%)	70,61	68,43	68,65
6	Tỷ lệ thụ tinh (%)	66,65	53,84	59,99
7	Tỷ lệ phôi dâu, nang (%)	37,50	28,57	33,33

2. Kết quả thử nghiệm kỹ thuật phân tách tinh trùng bằng FACS

Bảng 3. Kết quả phân tách tinh trùng bằng 4 phương pháp khác nhau

TT	Chỉ tiêu đánh giá	PP1 1.0 Drop Pure	PP2 1.0 Drop Enrich	PP3 1.0 Drop Single	PP4 1.0 Drop Yield
1	Hiệu quả tách (%)	48,81±5,3	72,34±4,28	56,21±5,36	77,16±7,94
2	Độ tinh sạch (%)	95,12±2,99	81,44±6,39	84,48±7,57	77,74±5,23
3	Tinh trùng sống (%)	35,78±5,13	35,65±5,61	40,14±12,23	44,96±10,58
4	Tinh trùng di động (%)	29,99±7,56	18,98±1,16	24,21±6,84	28,26±3,99
5	Tinh trùng kỳ hình (%)	74,58±15,87	78,16±10,76	89,43±1,12	77,83±9,95

Ghi chú: - PP1: Phương pháp tách từng giọt đơn với tín hiệu mạnh nhất
- PP2: Phương pháp tách từng giọt đơn với tín hiệu dương tính
- PP3: Phương pháp chỉ tách những giọt đơn
- PP4: Phương pháp tách những tế bào dương tính.

Kết quả thử nghiệm các phương pháp tách cho thấy ở cả 4 phương pháp tách, chất lượng tinh trùng sau phân tách đều giống nhau ở cả 3 chỉ tiêu là tỷ lệ tế bào sống, tỷ lệ tế bào di động và tỷ lệ tế bào dị dạng. Tuy nhiên, có sự khác biệt trong hiệu quả tách và độ tinh sạch của quần thể tinh trùng X, đặc biệt là hiệu quả tách. Hiệu quả tách thấp nhất là ở PP1 và PP3 với 48,81±5,3% và 56,21±5,36%; trong khi đó hiệu quả phân tích của PP2 và PP4 cao hơn và như nhau (72,34±4,28% và 77,16±7,94%). Trong khi đó, độ tinh sạch của 3 phương pháp 2, 3, và 4 là như nhau (81,44±6,39%, 84,48±7,57% và 77,74±5,23%) và thấp hơn của PP1 (95,12±2,99%). Kết quả này cho thấy PP1 cho hiệu quả phân tách thấp, tỷ lệ tế bào thất thoát rất lớn (hơn 50%) nhưng tỷ lệ tinh trùng X đạt được cao nhất. Và tỷ lệ này tương đương với các sản phẩm hiện có trên thị trường.

Bảng 4. Kết quả so sánh chất lượng tinh trùng trước và sau khi phân tách bằng FACS

Chỉ tiêu đánh giá	Trước khi tách (sau giải đông)	Sau khi phân tách bằng FACS			
		PP1	PP2	PP3	PP4
Tinh trùng sống (%)	91,33±2,52	35,78±5,13	35,65±5,61	40,14±12,23	44,96±10,58
Tinh trùng di động (%)	73,67±8,08	29,99±7,56	18,98±1,16	24,21±6,84	28,26±3,99
Tinh trùng kỳ hình (%)	23,00±7,21	74,58±15,87	78,16±10,76	89,43±1,12	77,83±9,95

Kết quả so sánh cho thấy chất lượng tinh trùng giảm mạnh sau khi phân tách bằng cả 4 phương pháp. Độ di động và tỷ lệ tế bào sống giảm đi gần 1/2 so với trước khi phân tách; đặc biệt tỷ lệ tinh trùng kỳ hình cao gấp gần 3 lần so với trước khi tách (chủ yếu là tình trạng đứt và gãy đuôi tinh trùng).

Bảng 5. Kết quả đánh giá chất lượng tinh trùng trong tinh bò đông lạnh bình thường và tinh đã phân tách ngoại nhập

TT	Các chỉ tiêu theo dõi	Tinh bình thường n = 3	Tinh phân tác n = 3h
1	Nồng độ theo máy đếm quang phổ(1) Nồng độ theo buồng đếm Neubauer	26,99±1,61 24,05±2,23	25,82±1,24 1,53±0,09
2	Tỷ lệ sống (%)	67,33±4,52	56,53±6,79
3	Tỷ lệ kỳ hình (%)	19,90±3,99	27,2±5,55
4	Tỷ lệ di động (%)	62,73±4,02	30,07±8,28
5	Khả năng thụ tinh (%)(2)	31,47±5,96	21,10±6,22

Ghi chú: (1) Nồng độ tinh trùng đo theo máy đo nồng độ tinh trùng của IMV

(2) Khả năng thụ tinh được đánh giá qua tỷ lệ thụ tinh *in vitro* trên nguồn trứng thu từ lò mổ và kết quả tạo phôi 2 tb sau 48 giờ thụ tinh

Nhận xét chung: Tinh đã phân tách ngoại nhập có chất lượng thấp hơn tinh đông lạnh bình thường, cụ thể là nồng độ chỉ bằng 1/10, tỷ lệ sống thấp hơn, tỷ lệ kỳ hình cao hơn và tỷ lệ di động chỉ bằng 50%. Đồng thời, tỷ lệ tạo phôi *in vitro* từ tinh phân tách ngoại nhập thấp hơn so với tinh đông lạnh bình thường, nhưng điểm khác biệt là tinh giới tính X sẽ tạo ra các phôi *in vitro* có giới tính là cái.

3. Kết quả thử nghiệm tạo phôi *in vitro* xác định trước giới tính

Bảng 6. Kết quả tạo phôi *in vitro* từ tinh phân tách ngoại nhập với 2 nguồn trứng

TT	Các chỉ tiêu theo dõi	Lô đối chứng	Lô thí nghiệm	P
	Loại tinh sử dụng	Tinh phân tách ngoại nhập		
	Loại trứng sử dụng	Lấy từ BT lò mổ	Lấy từ OPU	
1	Số buồng trứng thực hiện	271	92	
2	Số trứng thu được	2.649	150	
3	Số trứng thu được/buồng trứng	9,76	1,63	
4	Số trứng (chín) đem thụ tinh *in vitro*	1.134	105	
5	Tỷ lệ trứng chín IVM (%)	42,80 ±12,15	70,00 ± 11,30	< 0,001
6	Tỷ lệ thụ tinh IVF (%)	25,22 ± 15,31	56,19 ± 11,84	< 0,001
7	Số lượng phôi tạo thành	286	59	
8	Số lượng phôi dâu, phôi nang	24	20	
9	Tỷ lệ phôi dâu, phôi nang IVC (%) (Min - Max)	8,39 ± 8,48 (0% - 36,36%)	33,90 ± 21,45 (0% - 66,67%)	< 0,001

Ở lô đối chứng, từ 271 buồng trứng lấy từ lò mổ, hút được 2.649 trứng, tỷ lệ IVM chỉ đạt 42,8% với 1.134 trứng chín đạt tiêu chuẩn làm thụ tinh *in vitro*, tỷ lệ IVF chỉ đạt 25,22% để tạo ra 286 phôi và tỷ lệ IVC chỉ đạt 8,39% với 24 phôi phát triển đến mức phôi dâu, phôi nang. Trong khi đó, ở lô TN với 150 trứng hút được trên 92 buồng trứng khi thực hiện OPU, có 105 trứng chín đạt tỷ lệ IVM là 70%, có 59 phôi tạo thành đạt tỷ lệ IVF là 56,19% và có 20 phôi phát triển đến phôi dâu, phôi nang đạt tỷ lệ IVC là 33,9%. Các tỷ lệ IVM, IVF và IVC của lô TN đều cao hơn đáng kể so với lô đối chứng, sự sai khác rất có ý nghĩa thống kê với mức P<0,001. Điều này, có thể giải thích là do trong điều kiện thực tiễn ở phía Nam, bò sữa khi đưa đến lò mổ, đều trong tình trạng khó khăn về sinh sản, qua điều trị bằng kháng sinh, kích dục tố nhiều lần thất bại, nên bị loại thải. Chính vì vậy, buồng trứng thu được có chất lượng rất thấp nên khó thu được nhiều trứng đạt chất lượng phục vụ cho thụ tinh *in vitro*. Trong khi đó, trứng thu được từ OPU là trên những bò cái sống, đang cho sữa và có khả năng sinh sản

tốt, nên mặc dù số lượng trứng trung bình thu được trên buồng trứng là thấp hơn nhiều so với trứng thu được từ buồng trứng lò mổ (1,63 trứng/BT so với 9,76 trứng/BT, tương ứng), nhưng chất lượng trứng tốt hơn, chứng minh qua các tỷ lệ IVM, IVF và IVC đều cao hơn hẳn.

4. Kết quả tạo bê cái hướng sữa từ phôi *in vitro* xác định trước giới tính

Đã thử nghiệm cấy phôi *in vitro* đông lạnh (từ tinh phân tách mua trên thị trường với trứng OPU) trong 3 đợt trên 27 lượt bò sữa (21 con). Kết quả bước đầu có 2 bò cái thụ thai nhưng tỷ lệ thụ thai rất thấp 7,5% (2/27).

IV. KẾT LUẬN

- Quy trình kỹ thuật hút trứng trên buồng trứng bò cái sống (OPU) là nguồn cung cấp trứng chất lượng cho thụ tinh *in vitro*, nên thực hiện OPU với tần suất 1 lần/2 tuần, có thể kết hợp với sử dụng kích dục tố HTNC hay FSH để nâng cao hiệu quả thực hiện OPU. Hiệu suất thực hiện OPU chưa cao, đạt 50% với 1,63 trứng/buồng trứng.

- Bước đầu nghiên cứu tìm hiểu và thiết lập các thông số cơ bản của quy trình phân tách tinh trùng X từ tinh trùng bò đông lạnh. Tuy nhiên hiệu quả phân tách còn hạn chế. Chất lượng tinh trùng (tỷ lệ sống và di động) giảm hơn 50%, trong khi tỷ lệ kỳ hình tăng gấp 3 lần sau khi phân tách, các chỉ tiêu này thấp hơn so với tinh phân tách hiện đang bán trên thị trường, nên chưa sử dụng để tạo phôi *in vitro*.

- Kỹ thuật OPU cung cấp số lượng trứng trên một buồng trứng ít hơn so với trứng lấy từ buồng trứng lò mổ, nhưng chất lượng cao hơn hẳn, nên khi sử dụng kết hợp với tinh phân tách ngoại nhập để tạo phôi *in vitro*, các tỷ lệ trứng chín, tỷ lệ thụ tinh và tỷ lệ phát triển lên phôi dâu, phôi nang đều cao hơn đáng kể.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chung Anh Dũng (2011). *Công nghệ sinh sản trên bò*. Nhà xuất bản Nông nghiệp, sách kỹ thuật 300 trang.
2. Hiệp hội kỹ thuật gia súc Nhật (Japan Livestock Technology Association) (1995). *Manual of Bovine Embryo Transfer*. Written by Dr. Hiroshi Kanagawa, Dr. Itsuo Shimohira and Mr. Norio Saitoh.
3. Nguyễn Văn Lý, Lưu Công Khánh, Nguyễn Thị Thoa, Phan Lê Sơn, Chu Thị Yến, Nguyễn Thị Kim Anh và Vũ Ngọc Hiệu (2006). *Nghiên cứu ứng dụng kỹ thuật siêu âm thu tế bào trứng từ bò sống để tạo phôi trong ống nghiệm*. Bộ môn cấy truyền phôi, Viện Chăn nuôi.
4. Phan Kim Ngọc (2009). *Tạo phôi bò giai đoạn blastocyst bằng công nghệ thụ tinh trong ống nghiệm từ nguồn giao tử nội và ngoại nhập*. Đại học Khoa học tự nhiên TPHCM, nghiệm thu ngày 26/03/2009.

Ngày nhận bài: 20/3/2015
Người phản biện: TS. Nguyễn Ngọc Tấn
Ngày phản biện: 15/4/2015
Ngày duyệt đăng: 14/5/2015