ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC

HỨA NGUYỆT MAI

NGHIÊN CỨU ẢNH HƯỞNG BỔ SUNG TẾ BÀO VÀ HORMONE LÊN SỰ PHÁT TRIỂN CỦA PHÔI LỢN THỤ TINH ỐNG NGHIỆM

Chuyên ngành: Công nghệ sinh học
Mã số: 60 42 80

LUẬN VĂN THẠC SĨ CÔNG NGHỆ SINH HỌC

Người hướng dẫn khoa học: TS. Bùi Xuân Nguyên

Thái Nguyên, 2012

LỜI CAM ĐOAN

Tôi xin cam đoan đây là công trình nghiên cứu do chính tôi thực hiện. Các số liệu, kết quả nghiên cứu trong luận văn này là trung thực và chưa có ai công bố trong bất cứ công trình nào khác.

Thái Nguyên, ngày 30 tháng 7 năm 2012

Tác giả

Hứa Nguyệt Mai

LỜI CẢM ƠN

Trước hết, tôi xin bày tỏ lòng biết ơn chân thành và sâu sắc nhất tới TS. Bùi Xuân Nguyên - nguyên Trưởng phòng Công nghệ phôi - Viện công nghệ sinh học đã định hướng nghiên cứu, tận tình hướng dẫn và dìu dắt tôi trong suốt quá trình thực hiện và hoàn thành luận văn.

Tôi xin bày tỏ lòng cảm ơn chân thành đến tập thể cán bộ phòng Công nghệ phôi, Viện Công nghệ sinh học, đặc biệt là TS. Nguyễn Thị Ước đã nhiệt tình giúp đỡ, góp ý cho tôi trong quá trình thực hiện những thí nghiệm liên quan đến luận văn. Tôi xin chân thành cảm ơn những tình cảm quý báu đó.

Tôi cũng xin bày tỏ lòng biết ơn sâu sắc tới các thầy cô trong ban chủ nhiệm Khoa, các anh chị trong Khoa Khoa học Sự sống - trường Đại học Khoa học đã luôn tạo điều kiện, quan tâm và giúp đỡ tôi trong quá trình tôi học tập, nghiên cứu.

Đồng thời tôi cũng xin bày tỏ lòng biết ơn đến những người thân trong gia đình, đồng nghiệp và các bạn bè của tôi đã có những khích lệ tinh thần và những quan tâm sâu sắc trong suốt thời gian tôi thực hiện luận văn này.

Một lần nữa tôi xin chân thành cảm ơn!

Tác giả

Hứa Nguyệt Mai

MỤC LỤC

Trang

LỜI CAM ĐOAN ..... **i**
LỜI CẢM ƠN ..... **ii**
MỤC LỤC ..... **iii**
DANH MỤC CÁC CHỮ VIẾT TẮT ..... **v**
DANH MỤC CÁC BẢNG TRONG LUẬN VĂN ..... **vi**
DANH MỤC CÁC HÌNH ..... **vii**
MỞ ĐẦU **1**
1. Đặt vấn đề 1
2. Mục tiêu của đề tài 2
3. Nội dung nghiên cứu 2
CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN TÀI LIỆU **3**
1.1. Sự hình thành và phát triển phôi *in vivo* 3
1.1.1. Sự thụ tinh 3
1.1.2. Quá trình thụ tinh 4
1.1.3. Những yếu tố đảm bảo xảy ra sự thụ tinh 5
1.1.4. Sự phát triển của phôi *in vivo* 6
1.1.5. Sự làm tổ của phôi 8
1.2. Các yếu tố ảnh hưởng lên sự phát triển của phôi *in vitro* 9
1.2.1. Thụ tinh trong ống nghiệm 9
1.2.2. Buồng trứng 10
1.2.3. Loại nang trứng 11
1.2.4. Quá trình nuôi thành thục trứng và các hormone bổ sung 12
1.2.5. Hệ thống nuôi phôi 13
1.3. Tình hình nghiên cứu ở Việt Nam 19
CHƯƠNG 2: ĐỐI TƯỢNG, VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU **21**
2.1. Đối tượng nghiên cứu 21
2.2. Địa điểm nghiên cứu 21
2.3. Vật liệu nghiên cứu 21

2.3.1. Dụng cụ, thiết bị 21
2.3.2. Hóa chất, môi trường 22
2.4. Phương pháp nghiên cứu 23
2.4.1. Phương pháp thu, bảo quản và vận chuyển buồng trứng 23
2.4.1.2. Phương pháp phân loại phẩm chất trứng 23
2.4.2. Phương pháp thu tế bào nguyên bào sợi phôi chuột *(Mouse Embryonic Fibroblast- MEF)* 25
2.4.3. Phương pháp thu cụm tế bào màng trong ống dẫn trứng 27
2.4.4. Phương pháp nuôi phôi và đánh giá sự phát triển của phôi 28
2.4.5. Phương pháp xử lý số liệu 30
CHƯƠNG 3: KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN 31
3.1. Kết quả nhân nuôi tế bào nguyên bào sợi từ bào thai chuột 31
3.2. Nghiên cứu phân lập, nhân nuôi tế bào màng trong ống dẫn trứng 34
3.2.1. Kết quả thu tế bào màng trong ống dẫn trứng..... 34
3.2.2. So sánh ảnh hưởng thời gian quay của cụm tế bào lên chất lượng của cụm tế bào thu được và cụm tế bào sau giải đông 36
3.3. Kết quả bổ sung hormone lên tỷ lệ trứng thành thục 37
3.4. Kết quả nuôi phôi từ các hệ thống môi trường 39
3.4.1. Hệ thống 1 (HT1) 39
3.4.2. Hệ thống 2 (HT2) 40
3.4.3. Hệ thống 3 (HT3) 41
3.4.4. Hệ thống 4 (HT4) 43
3.5. So sánh kết quả tạo phôi từ các hệ thống 44
3.5.1. So sánh tỷ lệ tạo phôi từ hệ thống 1, hệ thống 2 và hệ thống 3 44
3.5.2. So sánh tỷ lệ tạo phôi từ hệ thống 2 và hệ thống 4 45
3.5.3. So sánh tỷ lệ tạo phôi từ hệ thống 1, 2, 3 và hệ thống 4 46
KẾT LUẬN 49
KIẾN NGHỊ 50
TÀI LIỆU THAM KHẢO 51
DANH MỤC CÁC CÔNG TRÌNH CÓ LIÊN QUAN ĐẾN LUẬN VĂN 58

DANH MỤC CÁC CHỮ VIẾT TẮT

Từ viết tắt	Nghĩa tiếng Anh	Nghĩa tiếng Việt
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium	Môi trường DM
FPP	Fertilization promoting peptide	Peptide thúc đẩy sự thụ tinh
FBS	Fetal Bovine Serum	Huyết thanh bò
FSH	Follicle stimulating hormone	Hormon kích thích nang phát triển
IVC	In Vitro Culture	Nuôi cấy trong ống nghiệm
IVF	In Vitro Fertilization	Thụ tinh trong ống nghệm
IVP	In Vitro Production	Sản xuất trong ống nghiệm
IVM	In Vitro Maturation	Sự thành thục trong ống nghiệm
LH	Luteinsing Stimulating Hormone	Hormon tăng trưởng
MAT	Maturation	Thành thục
NCSU - 23	North Carolina State University 23	Đại học phía Bắc bang Carolina 23
NCSU - 37	North california state university 37	Đại học phía Bắc bang Carolina 37
PBS	Phosphate Buffer Saline	Dung dịch đệm
POSP	Porcine oviductal secretory protein	Ống dẫn trứng lợn tiết ra protêin
PMSG	Pregnant mare's serum gonadotropin	Huyết thanh ngựa chửa
TCM	Tissue Culture Medium	Môi trường nuôi cấy
ZP	Zone Pellucide	Màng trong suốt

DANH MỤC CÁC BẢNG TRONG LUẬN VĂN

Bảng	Tên bảng	Trang
2.1	Các dụng cụ, thiết bị dùng trong thí nghiệm	21
2.2	Nội dung và chi tiết thí nghiệm	29
3.1	Kết quả thu tế bào nguyên bào sợi thai chuột từ các bào thai chuột	31
3.2	Kết quả tốc độ nhân nuôi tế bào tươi và tế bào sau giải đông	32
3.3	Ảnh hưởng chất lượng vòi trứng đến tỷ lệ các cụm tế bào màng trong vòi trứng thu được	34
3.4	Kết quả theo dõi thời gian quay của các cụm tế bào thu được và cụm tế bào sau giải đông	36
3.5	Kết quả nuôi trứng thành thục	38
3.6	Kết quả tạo phôi trong môi trường cơ bản	40
3.7	Kết quả tạo phôi trong môi trường có bổ sung tế bào nguyên bào sợi thai chuột	41
3.8	Kết quả tạo phôi trong môi trường có bổ sung tế bào màng trong vòi trứng	42
3.9	Nuôi phôi trong môi trường bổ sung tế bào nguyên bào sợi thai chuột và tế bào màng vòi trứng	43

DANH MỤC CÁC HÌNH

Hình	Tên hình	Trang
1.1	Sự phát triển của hợp tử giai đoạn 2 phôi bào đến giai đoạn phôi dâu	7
1.2	Cơ quan sinh sản của lợn cái	8
2.1	Buồng trứng lợn và phân loại các tế bào trứng	25
2.2	Các bước thu cụm tế bào màng trong vòi trứng	28
3.1	Kết quả nhân nuôi tế bào nguyên bào sợi thai chuột	33
3.2	Biểu đồ tỷ lệ cụm tế bào màng trong vòi trứng ở các nhóm thí nghiệm	35
3.3	Kết quả nhân nuôi tế bào màng trong vòi trứng	37
3.4	Trứng MAT II và thể cực	39
3.5	Biểu đồ so sánh tỷ lệ phôi phát triển từ HT1, HT2, HT3	44
3.6	Biểu đồ so sánh tỷ lệ phôi phát triển từ HT2 và HT4	45
3.7	Biểu đồ so sánh tỷ lệ phôi phát triển từ HT1, HT2, HT3 và HT4	46
3.8	Kết quả tạo phôi từ các hệ thống nuôi phôi	48

MỞ ĐẦU

1. Đặt vấn đề

Ngày nay, công nghệ sinh học nói chung và công nghệ sinh học sinh sản nói riêng đã rất phát triển và đạt nhiều thành tựu quan trọng, đem lại nhiều ý nghĩa và lợi ích thiết thực trong cuộc sống. Một trong những thành tựu nổi bật nhất của công nghệ sinh học là sự kiện nhân bản vô tính thành công (1997) với sự ra đời của cừu Dolly. Còn trong sinh sản hữu tính thành tựu quan trọng nhất là tạo phôi trong ống nghiệm, phôi là nguồn vật liệu quan trọng trong chuyển cấy phôi tạo nguồn động vật đồng loạt, phục vụ cho các thử nghiệm trong y học, hoặc nhằm mục đích nâng cao năng suất vật nuôi trong chăn nuôi.

Nước ta là nước có ngành chăn nuôi lợn phát triển, song cũng là một điểm nóng về bảo vệ đa dạng sinh học nói chung và nguồn gen các giống lợn nói riêng. Trong vòng đời sinh sản của một con vật, chu kỳ sống của chúng có loài chỉ sinh ra 4-5 con cái thông qua sinh sản bình thường, trong khi thông qua thụ tinh ống nghiệm có thể tạo ra 50-80 con cái trong chu kỳ sống của chúng. Vì vậy thụ tinh ống nghiệm giữ vai trò quan trọng trong việc tạo ra nhiều động vật với số lượng lớn và đặc tính gen cũng sẽ được cải thiện đáng kể.

Kỹ thuật thụ tinh ống nghiệm trên động vật nói chung và kỹ thuật thụ tinh ống nghiệm trên lợn nói riêng đã có nhiều nghiên cứu về các yếu tố ảnh hưởng đến sự phát triển phôi, nhưng vấn đề quan tâm nhiều nhất đó là việc nghiên cứu bổ sung, thay thế các chất khác nhau vào các môi trường cơ bản ban đầu. Đã có nhiều nghiên cứu chứng minh tác dụng có lợi của đồng nuôi cấy đến sự phát triển của phôi như cải thiện chất lượng phôi, tăng tỷ lệ phát triển của phôi vào giai đoạn phôi nang [32], [64]. Bổ sung môi trường nuôi cấy với tế bào đệm như tế bào màng trong ống dẫn trứng là yếu tố tăng cường sự phát triển của phôi lợn trong ống nghiệm [14], [48]. Các nguyên bào sợi phôi chuột đã được sử dụng trong đồng nuôi cấy, nguyên bào sợi phôi chuột tiết ra các yếu tố nhằm nâng cao sự phát triển của phôi, cho kết quả tốt đối với sự phát triển của phôi bò và cừu [36], [47]. Cho đến nay các vấn đề về việc nghiên cứu môi trường tối ưu để có chất lượng phôi

phát triển tốt đã được cải thiện phần nào. Ở Việt Nam, việc nuôi thành thục và thụ tinh ống nghiệm các trứng lợn đã được thực hiện từ những năm đầu của thế kỷ 21 [3], [6]. Một số nghiên cứu đã được tiến hành trên đối tượng trứng và phôi lợn *in vitro* [4] [7], [9]. Tuy nhiên tỷ lệ thành thục của trứng và tỷ lệ tạo phôi vẫn còn thấp so với tỷ lệ chung trên thế giới. Nguyên nhân của hiện tượng này vẫn chưa được làm sáng tỏ. Việc nghiên cứu cải thiện hệ thống nuôi phôi *in vitro* bằng cách bổ sung các loại tế bào đệm như nguyên bào sợi thai chuột hay tế bào màng trong ống dẫn trứng nhằm nâng cao chất lượng phát triển cho các phôi động vật nói chung và phôi lợn nói riêng là cần thiết cho việc ứng dụng công nghệ này trong nghiên cứu và sản xuất.

Xuất phát từ những lý do trên chúng tôi tiến hành đề tài *"**Nghiên cứu ảnh hưởng bổ sung tế bào và hormone lên sự phát triển của phôi lợn thụ tinh ống nghiệm**"*.

2. Mục tiêu của đề tài

- Đánh giá được ảnh hưởng của việc bổ sung hormone, bổ sung tế bào màng trong ống dẫn trứng và nguyên bào sợi thai chuột vào môi trường nuôi phôi lên kết quả thụ tinh ống nghiệm ở lợn.

- Thu nhận được các kết quả thí nghiệm cần thiết về sản xuất và bảo quản tế bào, chế độ bổ sung tế bào nhằm góp phần nâng cao hiệu quả thụ tinh ống nghiệm ở lợn.

3. Nội dung nghiên cứu

- Thu trứng, nuôi thành thục trứng *in vitro* trong môi trường cơ bản và môi trường có bổ sung hormone.

- Thu và nhân nuôi tế bào màng trong ống dẫn trứng từ ống dẫn trứng lợn.

- Thu và nhân nuôi tế bào nguyên bào sợi từ bào thai chuột.

- Nuôi phôi trong môi trường cơ bản, môi trường có bổ sung tế bào màng vòi trứng và nguyên bào sợi phôi chuột.