

**ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN**  
**TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC**

**NGUYỄN THỊ NHUNG**

**“NGHIÊN CỨU ẢNH HƯỞNG CỦA TẾ BÀO ĐỆM  
( CELL-CO-CULTURE) LÊN SỰ THÀNH THỰC TRÚNG  
VÀ SỰ PHÁT TRIỂN PHÔI LỘN THỤ TINH ỒNG NGHIỆM ”**

**LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC**

**Hà Nội, 2012**

## **Lời cảm ơn!**

Dân gian ta có câu, không thầy đố mày làm nên. Là một học trò còn nhiều thiếu sót, kinh nghiệm chưa nhiều, để hoàn thành đề tài này của mình, tôi đã cần đến rất nhiều sự quan tâm, giúp đỡ tận tình của các thầy cô và bạn bè đồng nghiệp

Trước hết tôi không thể không kể đến sự hướng dẫn hết lòng của thầy TS. Bùi Xuân Nguyên trưởng phòng Công nghệ Phôi, người đã chỉ bảo tôi trong suốt quá trình thực hiện luận văn này. Là một người thầy có trình độ chuyên môn sâu, kiến thức rộng, tận tâm trong công việc và hết lòng vì các học trò. Tôi thật lòng thán phục năng lực làm việc và sự say mê khoa học trong con người của thầy. Trong thời gian được làm việc cùng thầy tôi cảm thấy mình thật may mắn khi có được sự hướng dẫn và định hướng của thầy. Sát cánh bên cạnh tôi là sự chỉ dẫn của cô TS. Nguyễn Thị Ước, cô đã dạy bảo và truyền đạt cho tôi rất nhiều những kinh nghiệm quý báu trong công việc cũng như trong cuộc sống.

Xin gửi lời cảm ơn đến TS. Nguyễn Văn Hạnh (Viện Công nghệ Sinh Học) đã có những nhận xét thẳng thắn và quý báu để giúp tôi làm việc được tốt hơn

Qua đây tôi cũng xin gửi lời cảm ơn đến TS. Nguyễn Việt Linh đã có những góp ý đúng đắn để tôi hoàn thành luận văn của mình

Xin chân thành cảm ơn sự giúp đỡ của các đồng nghiệp phòng Công nghệ Phôi đã luôn bên cạnh, ủng hộ tôi trong suốt thời gian qua!

Hà Nội, 2012

## Mục lục

	Trang
ĐẶT VẤN ĐỀ	8
PHẦN I: TỔNG QUAN TÀI LIỆU	11
1. Tế bào và quá trình thành thực, thụ tinh của tế bào trứng lợn	12
1.1 Cấu tạo buồng trứng lợn.	12
1.2. Cấu tạo tế bào trứng.	13
1.3. Sự thành thực của tế bào trứng.	14
1.3.1. Sự thành thực nhân.	14
1.3.2. Sự thành thực tế bào chất.	15
1.3.3. Một số nhân tố điều hòa hoạt động của tế bào trứng.	16
1.4. Sự thụ tinh và phát triển phôi in vivo ở lợn.	16
2. Tình hình nuôi thành thực trứng và thụ tinh ống nghiệm ở lợn.	17
2.1. Nuôi thành thực trứng lợn.	17
2.2. Thụ tinh và phát triển phôi in vitro ở lợn.	19
3. Ảnh hưởng của co-culture với tế bào đệm lên sự thành thực trứng và phát triển phôi.	23
3.1. Tế bào màng vòi trứng, vai trò của tế bào màng vòi trứng lên sự thành thực trứng và phát triển của phôi.	23
3.1.1. Tế bào màng trong vòi trứng	23
3.1.2. Vai trò của tế bào màng trong vòi trứng.	23
3.2. Ảnh hưởng của nguyên bào sợi bào thai chuột (Fibroblast cells) lên sự thành thực trứng và phát triển của phôi.	25
PHẦN II. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP	28
1. Nguyên vật liệu	29

1.1. Đối tượng thí nghiệm.	29
1.2. Dụng cụ thí nghiệm.	29
1.3. Thiết bị thí nghiệm.	29
1.4. Hóa chất và môi trường	29
2. Phương pháp	32
2.1. Phương pháp thu nhận buồng trứng.	32
2.2. Nuôi thành thực trứng invitro.	33
2.3. Nuôi thành thực trứng với môi trường bổ sung nguyên bào sợi thai chuột.	33
2.4. Nuôi thành thực trứng với môi trường bổ sung tế bào màng vòi trứng.	34
2.5. Quan sát hình thái, đánh giá mức độ thành thực của trứng.	35
2.6. Nhuộm và đánh giá các giai đoạn phát triển của trứng.	35
2.7. Phương pháp thụ tinh trong ống nghiệm.	36
2.8. Đánh giá chất lượng và sự phát triển của phôi lợn thụ tinh ống nghiệm.	36
2.9. Phương pháp thống kê và xử lý số liệu.	36
<b>PHẦN III: KẾT QUẢ VÀ BÀN LUẬN</b>	37
1. Kết quả thu và phân loại trứng.	38
2. Kết quả nuôi thành thực trứng.	40
2.1. Ảnh hưởng của co-culture với tế bào sợi bào thai chuột lên sự thành thực trứng.	40
2.2. Ảnh hưởng của co-culture với tế bào màng trong vòi trứng (oviduct cell) lên sự thành thực của trứng.	41
2.3. Ảnh hưởng của co-culture cùng lúc với với tế bào sợi bào thai chuột và tế bào màng trong vòi trứng lên sự thành thực của trứng.	43
3. Kết quả thụ tinh và phát triển phôi.	44

3.1. Ảnh hưởng của co-culture với tế bào sợi bào thai chuột lên sự phát triển phôi thụ tinh ống nghiệm.	44
3.2. Ảnh hưởng của co-culture với tế bào màng trong vôi trứng lên sự phát triển phôi thụ tinh ống nghiệm.	46
3.3. Ảnh hưởng của co-culture cùng lúc với với tế bào sợi bào thai chuột và tế bào màng trong vôi trứng lên sự thụ tinh và phát triển phôi.	49
IV KẾT LUẬN	54
TAI LIỆU THAM KHẢO	62

## **Danh mục các từ viết tắt.**

Thụ tinh ống nghiệm	TTON
In vitro fertilization	IVF
Nuclear deoxyribonucleic acid	DNA
Luteinizing hormone	LH
Nhiễm sắc thể	NST
Nuclear ribonucleic acid	RNA
Maturation promoting factor	MPF
Follicle stimulating hormone	FSH
In vitro maturation	IVM
Maturation promoting factor	MPF
Cumulus oocyte complex	COC
Metaphase I	MI
Metaphase II	MII
Germinal vesicle	GV

## **Danh mục hình.**

Hình 1: Thai chuột 14 ngày tuổi

Hình 2: Miếng cơ thai chuột

Hình 3: Tế bào sợi thai chuột sau 4 ngày nuôi

Hình 4: Tế bào sợi thai chuột sau 10 ngày nuôi

Hình 5: Vòi trứng lợn

Hình 6: Tế bào màng trong vòi trứng ngay sau khi thu

Hình 7: Các cụm tế bào màng trong vòi trứng sau nuôi 1 ngày

Hình 8: Một cụm tế bào màng trong vòi trứng điển hình

Hình 9: Buồng trứng lợn thu từ lò mổ

Hình 10: Trứng lợn ngay sau khi thu

Hình 11: Trứng lợn sau nuôi 22 giờ

Hình 12: Trứng lợn nuôi trong môi trường bổ sung tế bào màng trong vòi trứng

Hình 13: Trứng thành thực sau khi tách cumulus (x1600)

Hình 14: Trứng giai đoạn bóng mầm

Hình 15: Trứng giai đoạn metaphase I

Hình 16: Giai đoạn metaphase II

Hình 17: Phôi giai đoạn 2 và 4 tế bào

Hình 18: Phôi 8 tế bào

Hình 19: Phôi dâu

Hình 20: Phôi nang

## **Danh mục bảng**

Bảng 1: Kết quả thu và phân loại trứng ở các nang có kích thước > 3 mm	38
Bảng 2: Kết quả thu và phân loại trứng ở các nang có kích thước 2-3 mm.	39
Bảng 3: Ảnh hưởng của tế bào sợi thai chuột lên tỉ lệ thành thực của trứng lợn	41
Bảng 4: Ảnh hưởng của tế bào màng trong vòi trứng lên chất lượng trứng lợn sau nuôi.	42
Bảng 5: Ảnh hưởng của việc bổ sung cả hai loại tế bào vào môi trường nuôi trứng lên tỉ lệ thành thực của trứng lợn.	43
Bảng 6.1: Ảnh hưởng của tế bào sợi thai chuột lên chất lượng phôi thu từ các nang > 3 mm	44
Bảng 6.2: Ảnh hưởng của tế bào sợi thai chuột lên chất lượng phôi thu từ các nang 2-3 mm	45
Bảng 7.1: Kết quả về sự phát triển của phôi lợn khi trứng nuôi trong môi trường IVM có bổ sung tế bào màng trong vòi trứng ( <i>Đối với nang &gt; 3 mm</i> ).	47
Bảng 7.2: Kết quả về sự phát triển của phôi lợn khi trứng nuôi trong môi trường IVM có bổ sung tế bào màng trong vòi trứng ( <i>Đối với nang 2- 3 mm</i> ).	48
Bảng 8.1: Sự phát triển phôi khi bổ sung vào môi trường nuôi trứng cả hai loại tế bào ( <i>nang &gt; 3 mm</i> )	49
Bảng 8.2: Sự phát triển phôi khi bổ sung vào môi trường nuôi	50



trứng cả hai loại tế bào (*nang 2-3 mm*)

## **ĐẶT VẤN ĐỀ**

Kỹ thuật thụ tinh ống nghiệm (TTON) hay kỹ thuật IVF (*in vitro fertilization*) giúp trứng và tinh trùng thụ tinh bên ngoài cơ thể là bước đột phá quan trọng trong ngành y học và sinh học. Cho đến nay, thụ tinh ống nghiệm được áp dụng trên rất nhiều các loài động vật khác nhau và ở hầu hết các nước trên thế giới. Năm 1959 Chang và cộng sự đã tạo ra chú thỏ (động vật có vú đầu tiên) bằng phương pháp thụ tinh ống nghiệm. Tiếp theo đó là sự thành công trên hàng loạt các đối tượng như cừu, chuột đồng, mèo, khỉ ...

Ngày 25 tháng 7 năm 1978 em bé đầu tiên được ra đời bằng phương pháp TTON đã mở ra hi vọng cho hàng nghìn cặp vợ chồng hiếm muộn trên khắp thế giới. Trong những năm đầu tiên các nhà khoa học đã phải thực hiện khoảng 5000 chu kỳ để có hai trường hợp em bé TTON ra đời. Sau 2 năm với những cố gắng không nhỏ, em bé TTON đã được ra đời tại Pháp và Úc. Vào thời gian đó, không ai có thể nghĩ rằng chỉ hơn 30 năm sau, 5 triệu em bé TTON đã được sinh ra ở nhiều nước trên thế giới. Giải Nobel Sinh lý và Y học năm 2010 được trao cho TS Adward do công trình nghiên cứu thành công kỹ thuật TTON trên người vào năm 1978 và đóng góp cho việc phát triển kỹ thuật này trên toàn thế giới.

Nhằm mục đích cải thiện khả năng sinh sản của động vật cao sản, bảo tồn đa dạng các loài động vật quý hiếm, tăng khả năng thụ thai và điều trị vô sinh, kỹ thuật TTON trong những năm gần đây đã được quan tâm và đầu tư nhiều hơn. Tại Việt Nam, công nghệ Phôi và TTON đã được bắt đầu nghiên cứu tại Viện Khoa học và công nghệ Việt Nam từ những năm 1978 – 1980 và

đã đạt được nhiều thành công trên các đối tượng như thỏ (1978) trâu bò (1986, 2002). TTON đã được ứng dụng để điều trị vô sinh từ hơn 10 năm nay mặc dù đi sau thế giới và với những nền tảng khoa học còn nhiều hạn chế, việc phát triển TTON trên người ở Việt Nam đã đạt được nhiều thành công đáng khích lệ.

Lợn là động vật được quan tâm đặc biệt như một mô hình nghiên cứu y học có đặc điểm di truyền của loài người. Buồng trứng của lợn có chứa số lượng lớn (hơn 200.000) các nang trứng sơ cấp (primordial follicles). Trong những năm đầu thập kỉ 1980 người ta đã thu được các phôi in vivo từ lợn và các phôi này có thể nuôi, phát triển từ giai đoạn 4 tế bào đến giai đoạn phôi nang (blastocyst). Sau đó những hiểu biết về đặc điểm phát triển của trứng đã giúp hình thành các loại môi trường nuôi trứng thành thực trong điều kiện in vitro. Thụ tinh ống nghiệm trên đối tượng lợn được Chan và cộng sự công bố đầu tiên vào năm 1986. Mặc dù tế bào trứng lợn trưởng thành trong ống nghiệm có thể thụ tinh với tinh trùng một cách dễ dàng trong điều kiện thích hợp. Sự phát triển phôi lợn in vitro vẫn thu kém nhiều so với điều kiện in vivo và những nguyên nhân cụ thể dẫn đến sự khác biệt này vẫn là một trong những vấn đề cần được giải quyết.

Các kết quả nghiên cứu TTON lợn ở Việt Nam trong những năm gần đây cho thấy do đặc điểm khá đặc trưng về phương thức nuôi dưỡng, đặc điểm thời tiết, độ tuổi giết thịt... kết quả TTON từ nguồn trứng lợn thu ở Việt Nam có khác biệt so với kết quả TTON ở một số nước khác, việc tạo được nguồn trứng chất lượng đảm bảo là một trong những chìa khóa then chốt nhằm nâng cao hiệu quả TTON.