

**VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT
ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN**

LÊ THANH QUANG

**NGHIÊN CỨU NÂNG CAO HIỆU QUẢ HỆ THỐNG
TẠO PHÔI IN VITRO Ở LỢN**

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

HÀ NỘI, 12/2015

**VIỆN SINH THÁI VÀ TÀI NGUYÊN SINH VẬT
ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN**

LÊ THANH QUANG

**NGHIÊN CỨU NÂNG CAO HIỆU QUẢ HỆ THỐNG
TẠO PHÔI IN VITRO Ở LỢN**

LUẬN VĂN THẠC SĨ SINH HỌC

Chuyên ngành: Động vật học

Mã số: 60 42 01 03

NGƯỜI HƯỚNG DẪN KHOA HỌC: TS. NGUYỄN VIỆT LINH

HÀ NỘI, 12/2015

LỜI CẢM ƠN

Tôi xin gửi lời cảm ơn chân thành và sâu sắc tới TS. Nguyễn Việt Linh, chủ nhiệm đề tài, người thầy đã tận tình hướng dẫn, tạo mọi điều kiện thuận lợi để tôi hoàn thành luận văn này.

Tôi cũng xin gửi lời cảm ơn chân thành tới tập thể cán bộ nghiên cứu Phòng Công nghệ Phôi đặc biệt là TS. Nguyễn Văn Hạnh, Ths. Nguyễn Thị Hiệp, Ths. Nguyễn Thị Nhung đã nhiệt tình giúp đỡ, ủng hộ và góp ý để tôi hoàn thành luận văn này.

Luận văn được hoàn thành với sự tài trợ của Quỹ Phát triển khoa học và công nghệ quốc gia trong khuôn khổ đề tài “Nghiên cứu ảnh hưởng của giọt noãn bào chất đơn tính lên sự hoạt hóa trứng và sự phát triển của phôi” mã số 106.12-2012.93 do TS. Nguyễn Việt Linh chủ nhiệm.

Tôi xin cảm ơn Viện Sinh thái và Tài nguyên sinh vật đã tạo điều kiện về thủ tục hành chính để tôi bảo vệ luận văn này.

Cuối cùng tôi xin gửi lời cảm ơn tới gia đình, bạn bè, những người đã luôn sát cánh, ủng hộ tôi trong suốt quá trình học tập và thực hiện luận văn này.

Xin chân thành cảm ơn!

Hà Nội, ngày 11 tháng 12 năm 2015

Học viên

Lê Thanh Quang

MỤC LỤC

| NỘI DUNG | Số trang |
|--|----------|
| LỜI CẢM ƠN | i |
| MỤC LỤC | ii |
| DANH MỤC BẢNG | v |
| DANH MỤC BIỂU ĐỒ | vi |
| DANH MỤC TỪ VIẾT TẮT | vii |
| PHẦN I. MỞ ĐẦU | 1 |
| PHẦN II. TỔNG QUAN TÀI LIỆU | 3 |
| 2.1 <i>Cơ sở khoa học</i> | 3 |
| 2.1.1 Buồng trứng và quá trình hình thành nang trứng | 3 |
| 2.1.1.1 Đặc điểm của buồng trứng | 3 |
| 2.1.1.2 Quá trình hình thành và phát triển của nang trứng | 3 |
| 2.1.1.3 Sự hình thành và phát triển của tế bào trứng | 6 |
| 2.1.2 <i>Sự thành thục của tế bào trứng</i> | 9 |
| 2.1.3 <i>Sự thụ tinh của tế bào trứng động vật có vú</i> | 11 |
| 2.2 <i>Sự thành thục trứng lợn in vitro (In vitro maturation – IVM)</i> | 12 |
| 2.3 <i>Thụ tinh ống nghiệm và nuôi phôi in vitro (In vitro fertilization, In vitro Culutre – IVF, IVC)</i> | 14 |
| 2.3.1 <i>Thụ tinh ống nghiệm ở lợn</i> | 14 |

| | |
|--|----|
| 2.3.2 Quá trình nuôi phôi | 15 |
| 2.4 <i>Quá trình nuôi phôi với tế bào đệm (co culture)</i> | 15 |
| PHẦN III. ĐỐI TƯỢNG, NỘI DUNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU | 20 |
| 3.1 Đối tượng và phạm vi nghiên cứu | 20 |
| 3.2 Địa điểm và thời gian tiến hành nghiên cứu | 20 |
| 3.3 Nội dung nghiên cứu và các chỉ tiêu theo dõi | 20 |
| 3.4. Phương pháp nghiên cứu | 20 |
| 1. <i>Phương pháp thu nhận chất lượng tế bào trứng</i> | |
| 2. <i>Phương pháp phân loại chất lượng trứng</i> | |
| 3. <i>Phương pháp nuôi thành thực tế bào trứng lợn in vitro (In vitro maturation - IVM)</i> | |
| 4. <i>Phương pháp đo nồng độ GSH nội bào</i> | |
| 5. <i>Phương pháp đánh giá thành thực sau nuôi thành thực in vitro (IVM)</i> | |
| 6. <i>Phương pháp thụ tinh ống nghiệm tế bào trứng lợn với tinh trùng đông lạnh, giải đông</i> | |
| 7. <i>Phương pháp nuôi phôi</i> | |
| 8. <i>Phương pháp đánh giá chất lượng phôi nang</i> | |
| 9. <i>Phương pháp xử lý số liệu</i> | |

| | |
|--|----|
| PHẦN IV. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN | 28 |
| Phần I. Ảnh hưởng của việc bổ sung cysteine vào môi trường nuôi thành thực trong các nồng độ oxy khác nhau tới khả năng thành thực của tế bào trứng lợn | 28 |
| <i>Ảnh hưởng của việc bổ sung cysteine vào môi trường nuôi thành thực trong các nồng độ oxy khác nhau tới khả năng thành thực của tế bào trứng lợn</i> | 28 |
| <i>Ảnh hưởng của việc bổ sung cysteine vào môi trường nuôi thành thực trong các nồng độ oxy khác nhau tới nồng độ Glutathione (GSH) tế bào trứng lợn</i> | 31 |
| Phần II. Ảnh hưởng của việc bổ sung tế bào đệm tới sự phát triển phôi lợn thụ tinh ống nghiệm | 34 |
| PHẦN V. KẾT LUẬN VÀ ĐỀ NGHỊ | 42 |
| 5.1. Kết luận | 42 |
| 5.2. Đề nghị | 42 |
| ẢNH MINH HỌA | 43 |
| TÀI LIỆU THAM KHẢO | 45 |

DANH MỤC BẢNG

| Tên bảng | Trang |
|---|-------|
| Bảng 1. Ảnh hưởng của nồng độ cysteine lên sự thành thực <i>in vitro</i> tế bào trứng lợn ở nồng độ oxy 5%. | 28 |
| Bảng 2. Ảnh hưởng của nồng độ cysteine lên sự thành thực <i>in vitro</i> tế bào trứng lợn ở nồng độ oxy 20 %. | 29 |
| Bảng 3. Ảnh hưởng của việc bổ sung cysteine tới nồng độ Glutathione trong tế bào trứng lợn sau khi nuôi thành thực <i>in vitro</i> ở nồng độ oxy 5% | 32 |
| Bảng 4. Ảnh hưởng của việc bổ sung cysteine vào môi trường nuôi tới nồng độ Glutathione trong trứng ở nồng độ 20% oxy | 33 |
| Bảng 5. Ảnh hưởng của việc bổ sung tế bào đệm tới khả năng phân chia của trứng lợn thụ tinh ống nghiệm. | 35 |
| Bảng 6. Ảnh hưởng của tế bào đệm tới khả năng phát triển phôi vượt | 36 |

| | |
|--|----|
| qua giai đoạn 2-16 tế bào. | |
| Bảng 7. Ảnh hưởng của tế bào đệm tới sự phát triển của phôi lợn thụ tinh ống nghiệm đến giai đoạn phôi nang | 38 |
| Bảng 8. Ảnh hưởng của tế bào đệm tới sự phát triển của phôi lợn thụ tinh ống nghiệm đến chất lượng phôi nang | 40 |

DANH MỤC BIỂU ĐỒ

| Tên Biểu đồ | Trang |
|---|-------|
| Biểu đồ 1. So sánh ảnh hưởng việc bổ sung cysteine ở mức nồng độ oxy khác nhau tới khả năng thành thực của tế bào trứng lợn. | 31 |
| Biểu đồ 2. So sánh ảnh hưởng việc bổ sung cysteine ở mức nồng độ oxy khác nhau tới nồng độ GSH tế bào trứng lợn. | 34 |
| Biểu đồ 3. So sánh ảnh hưởng của tế bào đệm tới sự phân chia và sự phát triển phôi tới giai đoạn 2-16 tế bào của trứng lợn TTON | 37 |
| Biểu đồ 4. So sánh ảnh hưởng của tế bào đệm tới sự phân chia và hình thành phôi nang của trứng lợn TTON | 39 |
| Biểu đồ 5. So sánh ảnh hưởng của tế bào đệm tới sự phát triển phôi đến giai đoạn 2-16 tế bào và hình thành phôi nang của trứng lợn TTON | 40 |
| Biểu đồ 6. So sánh ảnh hưởng của tế bào đệm tới sự hình thành | 41 |

| | |
|--|--|
| phôi nang và chất lượng phôi nang của trứng lợn TTON | |
|--|--|

DANH MỤC CÁC TỪ VIẾT TẮT

| Từ viết tắt | Tiếng Anh | Nghĩa tiếng Việt |
|-------------|-------------------------------|-------------------------------|
| FBS | Fetal bovine serum | Huyết thanh bào thai bê |
| FM | Fertilization medium | Môi trường thụ tinh |
| FSH | Follicle stimulating hormone | Hormone kích thích nang trứng |
| GSH | Glutathione | |
| IVC | <i>In vitro</i> Culture | Nuôi phôi |
| IVF | <i>In vitro</i> fertilization | Thụ tinh ống nghiệm |
| IVM | <i>In vitro</i> muaturation | Thành thực ống nghiệm |
| LH | Luteinsing hormone | Hormone thể vàng |

| | | |
|---------------|--------------------------------------|----------------------------------|
| MI | Metaphase I | Trung kỳ I |
| MII | Metaphase II | Trung kỳ II |
| MPN | Male pronuclear | Tiền nhân đực |
| MEF | Mouse embryonic fibroblast | Tế bào sợi thai chuột |
| NCSU 23 | North Carolina State University 23 | Môi trường nuôi trứng, phôi |
| NCSU 37 | North California State University 37 | Môi trường nuôi trứng, phôi |
| NST | | Nhiễm sắc thể |
| Ống dẫn trứng | | ODT |
| pFF | Porcine follicle fluid | Dịch nang trứng lợn |
| POEC | Porcine oviductal epithelial cell | Tế bào biểu mô ống dẫn trứng lợn |
| PEEC | Porcine endometrial epithelial cell | Tế bào nội mạc tử cung lợn |
| PMSG | Pregnant mare's serum gonadotropin | Huyết thanh ngựa chữa |
| TCM | Tissue Culture Medium | Môi trường nuôi cấy |
| TN | | Thí nghiệm |