

Ảnh hưởng của cystein trong môi trường nuôi cấy tế bào trứng đến khả năng tạo phôi bằng kỹ thuật thụ tinh trong ống nghiệm (IVF) ở heo

• **Nguyễn Thanh Bình**

Trường Đại học Thủ Dầu Một, Bình Dương

(Bài nhận ngày 16 tháng 07 năm 2015, nhận đăng ngày 14 tháng 04 năm 2016)

TÓM TẮT

Nghiên cứu này nhằm đánh giá ảnh hưởng của việc bổ sung cystein vào môi trường nuôi cấy tế bào trứng đến hàm lượng glutathione (GSH) trong trứng và sự phát triển của phôi bằng kỹ thuật thụ tinh trong ống nghiệm ở heo. Khi bổ sung 0,6 mM cystein vào môi trường TCM 199 đã làm tăng lượng GSH trong trứng, nhận thấy rõ từ giờ nuôi thứ 40 và nồng độ GSH đạt mức cao nhất ở giờ nuôi thứ 44 (18,32 pmol/trứng). Sau 5 ngày nuôi phôi, trong tổng số 1000 trứng được nuôi chín và cho thụ tinh đã thu được 583 phôi 2

tế bào, 408 phôi 3-4 tế bào, 264 phôi 5-8 tế bào và 106 phôi dâu. Trong đó, tỷ lệ thụ tinh và phân chia phôi tốt nhất ở các trứng được nuôi chín 44 giờ, với 200 phôi có 2 tế bào (80 %), 161 phôi có 3-4 tế bào (64,4 %), 144 phôi có 5-8 tế bào (45,6 %) và 62 phôi dâu (24,8 %). Kết quả cho thấy thời điểm bổ sung cystein vào môi trường nuôi trứng và thời gian nuôi trứng đã ảnh hưởng đến nồng độ GSH trong trứng. Đồng thời, tỷ lệ phát triển phôi bị ảnh hưởng bởi thời gian nuôi chín và nồng độ GSH trong trứng.

Từ khóa: cystein, TCM, phôi, heo, GSH

MỞ ĐẦU

Tạo phôi heo bằng phương pháp thụ tinh trong ống nghiệm đã được nghiên cứu từ những năm cuối thế kỷ 20 [1]. Đến nay, phương pháp này vẫn được nghiên cứu với mong muốn tạo ra phôi heo với số lượng lớn và chất lượng ngày càng tốt hơn để phục vụ cho những mục đích nghiên cứu cơ bản cũng như nghiên cứu y sinh học [2]. Bằng kỹ thuật nuôi chín trứng trong ống nghiệm - thụ tinh trong ống nghiệm (IVM - IVF) người ta có thể chủ động được nguồn trứng phục vụ cho quá trình nghiên cứu. Mặc dù đã có nhiều

tiến bộ trong hệ thống IVM - IVF nhưng tỷ lệ phôi heo được tạo ra trong ống nghiệm thường thấp (khoảng 20 %) và chất lượng kém. Quá trình nuôi chín trứng heo *in vitro* diễn ra trong thời gian dài (trên 36 giờ), trứng phải thực hiện trao đổi chất. Khi đó trứng sản sinh ra một lượng chất oxy hóa, nếu các chất oxy hóa này tích tụ nhiều và không được chuyển hóa bởi các chất chống oxy hóa sẽ gây độc cho trứng. Điều này làm ảnh hưởng đến chất lượng trứng cũng như sự phát triển tiếp theo của phôi sau khi thụ tinh [3].

Glutathione (GSH) được tổng hợp trong tế bào của các loài động vật, có tác dụng bảo vệ tế bào khỏi bị oxy hóa. Trong quá trình thụ tinh *in vitro*, GSH có tác dụng làm giảm năng lượng cần thiết để tháo xoắn nhiễm sắc thể trước khi hình thành tiền nhân đực [4] và đóng vai trò quan trọng trong hình thành tiền nhân đực sau khi thụ tinh [5]. Trong quá trình phát triển phôi *in vitro*, GSH giúp tăng cường sự phát triển của phôi và duy trì hình thái trực chính phân bào giảm nhiễm của noãn, từ đó đảm bảo hình thành hợp tử bình thường [6]. Cystein (Cys) là một trong ba acid amine cấu tạo nên GSH. Mặc dù Cys tham gia vào quá trình tổng hợp GSH trong noãn nhưng trong môi trường tế bào, Cys lại dễ bị oxy hóa thành cystine. Khi bổ sung Cys làm tăng sự tổng hợp GSH nội bào [7].

Tiêu chuẩn trong đánh giá chất lượng trứng để thụ tinh trong ống nghiệm là trứng trưởng thành ở giai đoạn MII và có một thể cực. Ngoài ra, đánh giá nồng độ GSH trong trứng để xác định mức trưởng thành tế bào chất. Đồng thời, khả năng thụ tinh và phát triển của phôi tốt hơn khi trứng trưởng thành nhân và tế bào chất.

Ở Việt Nam, các nghiên cứu nuôi trứng thành noãn và thụ tinh trong ống nghiệm trên heo còn ít. Đặc biệt đánh giá GSH trong quá trình nuôi chín trứng chưa có và tỷ lệ phát triển phôi heo còn thấp.

VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Buồng trứng heo được thu nhận từ lò mổ Vissan - 420 Nơ Trang Long, quận Bình Thạnh, Thành phố Hồ Chí Minh. Tinh dịch tươi của heo đực giống Duroc được cung cấp bởi trại heo giống quốc gia Bình Minh - Tân Bình, Bình Minh, Trảng Bom, Đồng Nai.

Ngay sau khi heo cái được giết mổ, buồng trứng heo được cắt rời khỏi ống sinh dục. Sau đó, buồng trứng được rửa trong dung dịch 0,9 % NaCl có bổ sung kháng sinh (peniciline và streptomycine) 2 - 3 lần. Buồng trứng được trữ trong bình có chứa dung dịch nước muối 0,9 %

NaCl, có bổ sung kháng sinh và được chuyển ngay về phòng thí nghiệm trong vòng 2 giờ.

Tại phòng thí nghiệm, buồng trứng heo được rửa 2 lần với dung dịch nước muối sinh lý có kháng sinh. Các nang có đường kính 3 - 6 mm được chọn để thu nhận trứng. Buồng trứng có các nang đạt yêu cầu về đường kính được chọc hút và thu dịch nang trứng bằng ống tiêm 10 mL, kim 18G có chứa 1 mL dung dịch Dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS). Dịch nang trứng thu được được quan sát dưới kính hiển vi soi nổi để tìm noãn. Những trứng có tế bào chất đen đều và có từ 3 lớp tế bào ở trở lên bám đều xung quanh được thu nhận cho thí nghiệm.

Nuôi chín trứng

Trứng được nuôi chín trong môi trường TCM - 199 bổ sung 10 % fetal calf serum (FCS), penicilline và streptomycine. Trứng được nuôi trong vi giọt (25 noãn/100 μ L), có phủ dầu khoáng, trong tủ CO₂ ở 38,5 °C, 5 % CO₂, bão hòa hơi nước. Vi giọt được ổn định trong tủ CO₂ ở 38,5 °C, 5 % CO₂, bão hòa hơi nước ít nhất trước 2 giờ nuôi. Tại cuối mỗi thời gian nuôi chín, trứng được tiến hành đánh giá nồng độ GSH.

Thời gian nuôi chín trứng để đánh giá GSH từ 0 giờ đến 50 giờ nuôi, thời gian nuôi chín trứng để thụ tinh *in vitro* từ 36 giờ đến 48 giờ nuôi. 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) dễ bị khử bởi nhóm sulfhydryl của GSH tạo thành các anion có màu vàng được đo ở bước sóng 412 nm. Độ đậm màu tỉ lệ với nồng độ GSH.

Chuẩn bị tinh trùng

Tinh dịch tươi của heo đực giống Duroc, trại heo giống Bình Minh được sử dụng để chuẩn bị tinh trùng. Trước tiên 4 mL dung dịch D-PBS được cho vào ống falcon. Tiếp theo, 2 mL tinh dịch được cho vào đáy ống falcon sao cho tạo thành phân lớp tinh dịch và dung dịch D-PBS. Tinh trùng khô, được thu nhận từ tinh dịch bằng phương pháp bơi lên. Quá trình bơi lên được diễn

ra 2 giờ ở nhiệt độ phòng. Sau đó, lớp dịch tinh trùng phía trên được thu nhận và ly tâm 2000 vòng trong 5 phút. Cuối cùng, lớp cặn được thu nhận và huyền phù trở lại. Cặn huyền phù được điều chỉnh mật độ tinh trùng trong môi trường TL-Hepes để đạt nồng độ 1×10^6 tinh trùng/mL.

Thụ tinh và nuôi phôi

Trứng sau khi hoàn tất thời gian nuôi chín được loại bỏ lớp tế bào ở bằng cách dùng pipette Pasteur hút đầy nhiều lần. Sau đó, trứng được ủ với tinh trùng đã được điều chỉnh mật độ trong vi giọt môi trường (100 μ L tinh trùng/giọt), có phủ dầu khoáng. Vi giọt môi trường được chuẩn bị và cân bằng trong tủ ẩm $38,5^\circ\text{C}$, 5 % CO_2 ít nhất 2 giờ trước khi sử dụng. Các trứng được ủ với tinh trùng trong 6 giờ, ở điều kiện $38,5^\circ\text{C}$; 5 % CO_2 , bão hòa hơi nước.

Sau khi ủ trứng với tinh trùng 6 giờ, noãn được thụ tinh trong môi trường TL-Hepes được rửa trong môi trường nuôi phôi (PZM - 3 và 3,0 mg/mL BSA) để loại bỏ tinh trùng ra khỏi hợp tử giả định. Sau đó, các hợp tử giả định được nuôi trong vi giọt môi trường PZM - 3 + 3 mg/mL BSA (10 phôi/ 100 μ L môi trường nuôi phôi), có phủ dầu khoáng, ở $38,5^\circ\text{C}$; 5 % CO_2 , bão hòa hơi nước. Hợp tử giả định được nuôi đến 120 giờ và được theo dõi sự phát triển mỗi 24 giờ nuôi. Trứng được nuôi ở 4 mức thời gian nuôi khác nhau là 36 giờ, 40 giờ, 44 giờ và 48 giờ trong môi trường TCM199 + 5 % FCS. Sau khi nuôi

chín, các trứng được thụ tinh với tinh trùng đã được xử lý và hoạt hóa trong môi trường TL-Hepes. Nồng độ tinh trùng được sử dụng để thụ tinh là 1×10^6 tinh trùng/mL. Sau thụ tinh 6 giờ, các phôi giả định đều được chuyển sang nuôi tiếp trong cùng một môi trường PZM3 + 3 mg/mL BSA. Phôi giả định được nuôi đến 120 giờ và được theo dõi sự phát triển mỗi 24 giờ nuôi.

Xử lý số liệu

Các số liệu thu được của các thí nghiệm được phân tích thống kê để so sánh sự khác biệt giữa các nghiệm thức bằng phần mềm Statgraphic centurion XV.

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Nồng độ GSH trong noãn được nuôi *in vitro* có bổ sung cystein

Nồng độ GSH sau khi nuôi chín trứng ở 4 mốc thời gian khác nhau và được bổ sung 0,6 mM Cys ở 3 thời điểm khác nhau, trong quá trình nuôi được đo mật độ quang bằng máy quang phổ ở bước sóng 412 nm. Thí nghiệm được lặp lại 3 lần. Kết quả được thể hiện ở Bảng 1, khi bổ sung 0,6 mM Cys vào môi trường TCM 199 + 10 % FCS ở các thời điểm nuôi khác nhau (giờ 0 - bắt đầu nuôi, giờ 36 và giờ 40) đều làm tăng nồng độ GSH trong noãn heo so với không bổ sung Cys. Kết quả này phù hợp với Sawai và cs [8] bổ sung Cys trong môi trường không có serum ở các thời gian 0, 12, 24 và 36 giờ khi nuôi noãn 48 giờ đều làm tăng nồng độ GSH.

Bảng 1. Nồng độ GSH trong noãn theo thời gian nuôi chín noãn

	Thời điểm bổ sung	Số noãn [§]	Thời gian nuôi (giờ)			
			36	40	44	48
0	*	90	5,48 ^a ± 0,6	8,57 ^a ± 0,6	13,18 ^a ± 2,7	6,38 ^a ± 3,4
0,6	Giờ 0	90	7,15 ^b ± 0,8	10,51 ^a ± 1,2	15,52 ^b ± 0,91	8,31 ^b ± 1,3
	Giờ 36	90	5,37 ^a ± 0,5	12,20 ^b ± 0,44	16,67 ^b ± 1,4	10,32 ^c ± 0,5
	Giờ 40	90	-	9,12 ^a ± 0,5	18,32 ^c ± 1,3	11,40 ^c ± 0,7

^{a,b,c}: Các ký tự khác nhau trong cùng một cột thể hiện sự khác biệt về mặt thống kê ($P < 0,05$)

* Kết quả từ thí nghiệm 1

§: Thí nghiệm được lặp lại 3 lần

Đối với các trứng được nuôi đến 36 giờ, nồng độ GSH tăng khi Cys được bổ sung từ đầu quá trình nuôi noãn (từ 5,48 pmol/noãn lên 7,15 pmol/noãn) và khác biệt so với lô không bổ sung Cys. Ngược lại, bổ sung Cys ở giờ 36 làm giảm nồng độ GSH so với lô đối chứng (từ $5,48 \pm 0,60$ pmol/trứng xuống còn 5,37 pmol/trứng). Tuy nhiên, nồng độ GSH trong trứng của lô có bổ sung 0,6 mM Cys lúc giờ 36 khác biệt không có ý nghĩa thống kê so với lô không bổ sung Cys.

Đối với các noãn được nuôi đến 40 giờ, nồng độ GSH đạt cao nhất khi bổ sung Cys lúc giờ 36 (12,20 pmol/noãn) và khác biệt so với lô đối chứng. Mặc dù, khi Cys được thêm vào ở thời điểm ngay khi bắt đầu nuôi và giờ 40 đều làm tăng nồng độ GSH trong trứng nhưng không khác biệt so với lô không bổ sung Cys (10,51; 9,12 và 8,57 pmol/trứng).

Đối với các trứng được nuôi đến 44 giờ, nồng độ GSH trong trứng được nuôi trong môi trường có bổ sung Cys đều tăng và khác biệt so với lô không có bổ sung Cys. Nồng độ GSH đạt cao nhất khi bổ sung Cys lúc giờ 44 (18,32 pmol/noãn) và khác biệt so lô đối chứng. Mặc dù, nồng độ GSH của trứng khi thêm Cys vào ở thời điểm ngay khi bắt đầu nuôi và giờ 36 có khác biệt nhưng không có ý nghĩa (10,51 và 16,67 pmol/trứng).

Đối với các trứng được nuôi đến 48 giờ, nồng độ GSH trong trứng được nuôi trong môi trường có bổ sung Cys đều tăng và khác biệt so với lô không có bổ sung Cys. Nồng độ GSH đạt cao nhất khi bổ sung Cys lúc giờ 40 (từ $6,38 \pm 3,40$ pmol/ trứng lên 11,40 pmol/ trứng). Đồng thời, nồng độ GSH của trứng khi thêm Cys vào ở thời điểm giờ 36 chỉ đạt 10,32 pmol/ trứng, nhưng khác biệt không ý nghĩa so với việc bổ sung Cys lúc nuôi tại 40 giờ. Trong khi đó, nồng độ GSH trong trứng được nuôi có bổ sung Cys ngay khi bắt đầu nuôi chỉ đạt 8,31 pmol/ trứng.

Trong môi trường TCM 199 cũng có thành phần Cys nhưng với nồng độ rất thấp khoảng

0,0006 mM. Hơn nữa, trong môi trường *in vitro* Cys dễ dàng bị oxy hóa, nên với nồng độ Cys có trong môi trường TCM 199 thì không đủ để noãn heo tổng hợp GSH [4]. Vì thế, trong thí nghiệm này trứng được nuôi trong môi trường TCM 199 bổ sung 0,6 mM Cys vào ở ba thời điểm khác nhau của quá trình nuôi chín là giờ 0, giờ 36 và giờ 40 để đánh giá ảnh hưởng của thời điểm bổ sung Cys lên nồng độ GSH trong trứng.

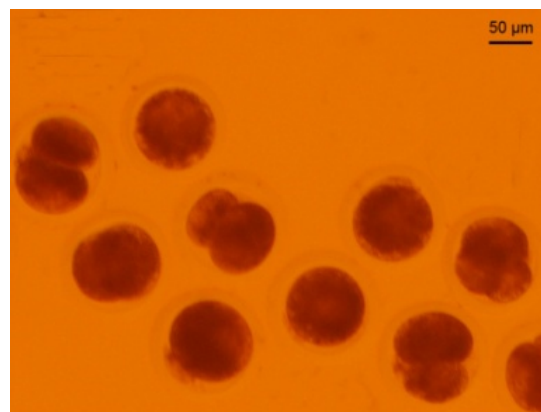
Nồng độ GSH đo được trong thí nghiệm này cao hơn so với các báo cáo trước đây. Theo Wang và cs (1997), nồng độ GSH của trứng heo trưởng thành trong môi trường NCSU 23 bổ sung 0,57 mM Cys và 10 % pFF là 5,8 pmol/ trứng.

Theo Sawai và cs [8], bổ sung Cys trong môi trường không có serum ở các thời gian 24, 36 và 48 giờ đều làm tăng nồng độ GSH nhưng không làm ảnh hưởng đến sự trưởng thành nhân, sự xâm nhập và tháo xoắn của tinh trùng.

Điều này cho thấy cần có một thời gian nhất định để Cys được tổng hợp chuyển vào trong trứng. Từ đó sẽ làm tăng nồng độ GSH khi bổ sung Cys vào môi trường.

Hiệu quả bổ sung cystein đến tỷ lệ thụ tinh

Sau khi thụ tinh hai ngày, phôi được quan sát (Hình 1) và kết quả được thể hiện ở Bảng 2.



Hình 1. Các phôi sau 2 ngày nuôi (ở vật kính 10X)

Bảng 2. Tỷ lệ thụ tinh trong ống nghiệm

Thời gian nuôi (giờ)	Tỷ lệ thụ tinh (%)
36	43,2 ^a
40	51,2 ^{ab}
44	80,0 ^c
48	58,8 ^b

a - c: Các ký tự khác nhau trong cùng một cột thể hiện sự khác biệt về mặt thống kê ($P < 0,05$)

Tỷ lệ thụ tinh đạt được từ 43,2 – 80 %. Tuy nhiên, thời gian nuôi chín trứng khác nhau thì tỷ lệ thụ tinh giữa các trứng cũng khác nhau. Trong đó đạt tỷ lệ thấp nhất ở lô có các trứng được nuôi chín 36 giờ (43,2 %) và khác biệt không có ý nghĩa thống kê so với lô nuôi 40 giờ (51,2 %). Mặc dù tỷ lệ thụ tinh của trứng được nuôi 48 giờ cao hơn trứng nuôi 40 giờ nhưng cũng không có ý nghĩa thống kê (58,8 % so với 51,2 %). Tỷ lệ thụ tinh đạt cao nhất ở lô có các trứng được nuôi chín 44 giờ (80 %) và khác biệt có ý nghĩa so với các lô thí nghiệm khác.

Điều này cho thấy với 44 giờ được nuôi chín *in vitro* thì trứng đã trưởng thành hoàn toàn, thích hợp nhất cho quá trình thụ tinh diễn ra. Kết quả này phù hợp với nhận định của Alminana và cs; Yoshioka và cs; Yuan và Krisher [9-11] tỷ lệ trứng trưởng thành (ở kỳ giữa II và có một thể cực) đạt từ 75 % đến 85 % ở những quy trình IVM có thời gian nuôi đến 44 giờ, các trứng này được dùng để thụ tinh trong ống nghiệm sẽ cho tỷ lệ tạo phôi *in vitro* cao.

Thời gian nuôi chín trứng trước khi thụ tinh có ảnh hưởng rất lớn. Thật vậy, các noãn này có thời gian nuôi chín từ 36 giờ đến 48 giờ, nên có sự khác biệt về tỷ lệ thụ tinh giữa các lô thí nghiệm. Sau khi tinh trùng xâm nhập thành công và vào trong tế bào chất thì sẽ làm tháo xoắn, hình thành tiền nhân đực, hợp nhất tiền nhân đực và tiền nhân cái, hình thành thể cực thứ hai, sau đó, phôi tiến hành lần phân chia đầu tiên, từ hợp tử với một tế bào thành phôi có 2 tế bào. Khi tế bào chất của trứng không hoặc chưa đủ trưởng thành thì các sự kiện trên khó xảy ra.

Khi so với các tác giả ở Việt Nam đã thực hiện quá trình thụ tinh *in vitro* thành công trên heo kết quả này cao hơn: H.T.L. Duyên [12] ghi nhận tỷ lệ phôi 2 tế bào 30,1 % khi xử lý tinh trùng bằng phương pháp Gradient Percoll và nuôi phôi trong môi trường NCSU23 + 0,4 % BSA. Trong khi thí nghiệm này, tinh trùng được xử lý bằng phương pháp swim up, nuôi phôi trong PZM3 + 3 mg/mL BSA.

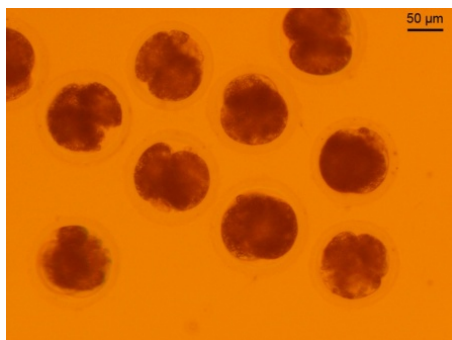
Hiệu quả bổ sung cystein đến khả năng thu phôi

Các phôi được nuôi tiếp tục đến ngày thứ 5 sau khi thụ tinh. Sự phát triển của phôi qua từng giai đoạn được ghi nhận tương ứng lúc 72; 96 và 120 giờ kể từ lúc thụ tinh. Kết quả thể hiện ở Bảng 3.

Bảng 3. Tỷ lệ phát triển phôi qua từng giai đoạn

Thời gian nuôi (giờ)	Tỷ lệ phôi phát triển đến giai đoạn (%)		
	phôi 3 - 4 tế bào	phôi 5 - 8 tế bào	phôi dâu
36	27,2 ^a	12,0 ^a	1,2 ^a
40	28,8 ^a	19,6 ^b	5,2 ^b
44	64,4 ^c	45,6 ^d	24,8 ^d
48	42,8 ^b	28,4 ^c	11,2 ^c

a - d: Các ký tự khác nhau trong cùng một cột thể hiện sự khác biệt về mặt thống kê ($P < 0,05$)



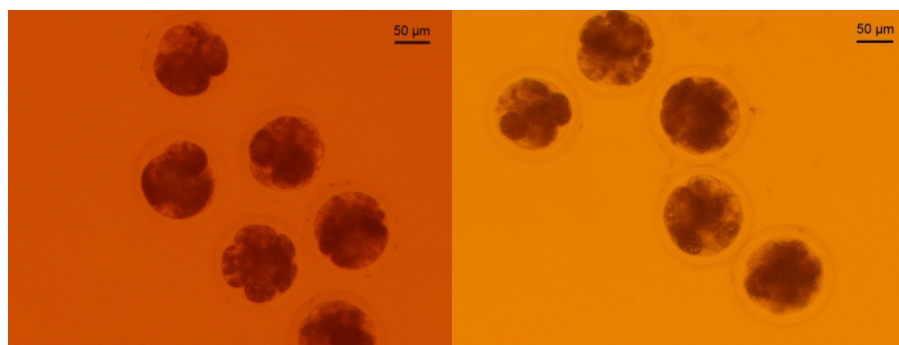
Hình 2. Các phôi 3-4 tế bào (ở vật kính 10X)

Sau 5 lần lặp lại thí nghiệm, tổng số phôi 3-4 tế bào thu được từ 4 lô thí nghiệm là 408 phôi. Tỷ lệ phát triển phôi đến giai đoạn 3-4 tế bào từ 27,2–64,4 % và có sự khác biệt giữa 4 lô thí nghiệm. Trong đó, thấp nhất ở lô 36 giờ (27,2 %) và không khác biệt so với lô nuôi 36 giờ (28,8 %). Cao nhất ở lô 44 giờ (64,4 %) và khác biệt so với các lô thí nghiệm khác. Còn lô nuôi 48 giờ, tỷ

lệ phôi 3-4 tế bào là 42,8 % (Hình 2) và khác biệt so với lô nuôi 36 giờ và 40 giờ.

Kết quả thu đạt được với tổng số phôi 5 - 8 tế bào từ 4 lô thí nghiệm là 264 phôi. Tỷ lệ phát triển phôi đến giai đoạn 5-8 tế bào khá cao (12-45,6 %) và có sự khác biệt giữa 4 lô thí nghiệm. Trong đó, thấp nhất ở lô 36 giờ (12 %) và khác biệt so với lô nuôi 40 giờ (19,6 %). Lô nuôi 48 giờ, tỷ lệ phôi 5 - 8 tế bào là 28,4 %. Cao nhất ở lô 44 giờ (45,6 %) và khác biệt so với các lô thí nghiệm khác.

Tổng số phôi dâu được tạo thành từ 4 lô thí nghiệm là 106 phôi. Tỷ lệ phôi dâu từ 1,2–24,8 % và có sự khác biệt giữa 4 lô thí nghiệm. Trong đó, thấp nhất là lô 36 giờ (1,2 %) và khác biệt so với lô nuôi 40 giờ (5,2 %). Lô nuôi 48 giờ, tỷ lệ phôi dâu là 11,2 % và khác biệt so với lô nuôi 36 giờ và 40 giờ. Cao nhất ở lô 44 giờ (24,8 %) và khác biệt so với các lô thí nghiệm khác.



Hình 3. Các phôi 5-8 tế bào và phôi dâu (ở vật kính 10X)

Kết quả cho thấy với thời gian nuôi trứng từ 36 giờ trở lên, các phôi đều phát triển đến giai đoạn phôi dâu (Hình 3). Với thời gian nuôi noãn trên 36 giờ, phôi đã truyền thông tin di truyền thành công và phôi heo đã vượt qua giai đoạn ngừng tăng trưởng.

Khi đánh giá chung khả năng phát triển đến giai đoạn phôi 3-4 tế bào và phôi 5-8 tế bào của trứng được nuôi 36 và 40 giờ, không có sự khác biệt. Nhưng khả năng phát triển đến giai đoạn

phôi dâu được nuôi 40 giờ tốt hơn so với 36 giờ. Mặc dù, trứng nuôi 36 giờ có tỷ lệ phôi dâu thấp (khoảng 1,2 %).

So với H.T.L. Duyên [12], kết quả đạt được cao hơn nhiều về tỷ lệ phôi dâu tạo thành. N.T.Thoa và cs [13] báo cáo tỷ lệ phôi dâu tạo thành khi nuôi phôi trong môi trường Pig - FM vẫn thấp hơn so với kết quả của nghiên cứu này (23,75 % so với 24,8 %).

KẾT LUẬN

Những kết quả đã trình bày trên đây cho thấy rằng thời điểm bổ sung cystein vào môi trường nuôi trứng và thời gian nuôi trứng đã ảnh hưởng đến nồng độ GSH trong trứng; tỷ lệ phát triển phôi bị ảnh hưởng bởi thời gian nuôi chín và nồng độ GSH trong trứng. Chúng tôi đã tạo được

phôi heo *in vitro* từ nguồn noãn heo được nuôi chín *in vitro* từ 36 giờ đến 48 giờ sử dụng môi trường PZM3 bổ sung 3 mg/mL BSA. Thời gian nuôi chín trứng có ảnh hưởng đến tỷ lệ thụ tinh và phát triển phôi heo. Tỷ lệ thụ tinh cao nhất (80 %) và tỷ lệ phôi dâu cao nhất (24,8 %) tương ứng với thời gian nuôi chín trứng là 44 giờ.

Effect of cysteine in maturation medium on embryos development by *in vitro* fertilization (IVF) in porcine

• **Nguyen Thanh Binh**

Thu Dau Mot University, Binh Duong

ABSTRACT

In this article, we studied the effect of cystein in maturation culture on glutathione concentration in oocyte and on embryos development by in vitro fertilization in porcine. 0.6 mM cysteine supplementation on TCM-199 medium has increased the amount of GSH in the oocyte. The GSH level began to increase at the 40th hour after cystein supple metation and attained the highest at the 44th hour (18.32 pmol/oocyte). After 5 days of embryos culture, a total of 1000 oocyte maturation and fertilization was obtained including 583 embryos containing 2 cells, 408 embryos containing 3-4 cells, 264

embryos containing 5-8 cells and 106 morula. In particular, fertilization rate and embryo division was the best in the oocyte maturation of the 44th hour with 200 embryos containing 2 cell (80 %), 161 embryos containing 3-4 cells (64.4 %), 114 embryos containing 5-8 cells (45.6 %) and 62 morula (24.8 %). The results showed that the time of the cysteine supplementation into medium and the time of muturation affected oocyte GSH level. In addition, embryoic development rate was also affected by maturation time and oocyte GSH level.

Key words: cysteine, TCM, embryo, porcine, GSH

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. W.T.R. Cheng, R.M. Moor, C. Polge, *In vitro* fertilization of pig and sheep oocytes matured *in vivo* and *in vitro*, *Theriogenology*, 25, 1, 146 (1986).
- [2]. N.T. Binh, Thụ tinh trong ống nghiệm trên heo. Trong Thụ tinh trong ống nghiệm (H.M. Tường, Đ.Q. Vinh, V.T.N. Lan, H.G.

Bảo, N.T. Bình, T.T.T. Bình, N.H. Duy, C.A. Dũng, L.T.H. Khả, N.T.T. Lan, N.K. Linh, N.T. Mai, G.Q. Như, H.T. Quế, N.N. Quỳnh, M.C.M. Tâm), Nhà xuất bản Giáo Dục, Thành phố Hồ Chí Minh, 623-632 (2011).

- [3]. T.B. Nguyen, V.T. Nguyen, M. Masashi, Effects of liquid preservation of sperm on their ability to activate oocytes and initiate preimplantational development after intracytoplasmic sperm injection in the pig, *Theriogenology*, 71, 9, 1440-1450 (2009).
- [4]. M. Yoshida, K. Ishigaki, T. Nagai, M. Chikyu, V.G. Pursel, Glutathione concentration during maturation and after fertilization in pig oocytes: relevance to the ability of oocytes to form male pronucleus, *Biology of Reproduction*, 49, 1, 89-94 (1993).
- [5]. A.C. Boquest, L.R. Abeydeera, W.H. Wang, B.N. Day, Effect of adding reduced glutathione during insemination on the development of porcine embryos *in vitro*, *Theriogenology*, 51, 7, 1311-1319 (1999).
- [6]. K.A. Zuelke, S.C. Jeffay, R.M. Zucker, S.D. Perreault, Glutathione (GSH) concentrations vary with the cell cycle in maturing hamster oocytes, zygotes, and pre-implantation stage embryos, *Molecular Reproduction and Development*, 64, 1, 106-112 (2003).
- [7]. H. Funahashi, B.N. Day, Effects of cumulus cells on glutathione content of porcine oocytes during *in vitro* maturation, *Journal of Animal Science*, 73, 1, 90 (1995).
- [8]. K. Sawai, H. Funahashi, K. Niwa, Stage-specific requirement of cysteine during *in vitro* maturation of porcine oocytes for glutathione synthesis associated with male pronuclear formation, *Biology of Reproduction*, 57, 1, 1-6 (1997).
- [9]. C. Alminana, M.A. Gil, C. Cuello, I. Caballero, J. Roca, J.M. Vazquez, E.A. Martinez, *In vitro* fertilization (IVF) in straws and a short gamete coincubation time improves the efficiency of porcine IVF, *Reproduction in Domestic Animals*, 43, 6, 747-752 (2008).
- [10]. K. Yoshioka, C. Suzuki, S. Itoh, K. Kikuchi, S. Iwamura, H. Rodriguez-Martinez, Production of piglets derived from *in vitro*-produced blastocysts fertilized and cultured in chemically defined media: effects of theophylline, adenosine, and cysteine during *in vitro* fertilization, *Biology of Reproduction*, 69, 6, 2092-2099 (2003).
- [11]. Y. Yuan, R.L. Krisher, Effect of ammonium during *in vitro* maturation on oocyte nuclear maturation and subsequent embryonic development in pigs, *Animal Reproduction Science*, 117, 3, 302-307 (2010).
- [12]. H.T.L. Duyên, Ứng dụng kỹ thuật thụ tinh *in vitro* và PCR xác định giới tính trên heo (*Sus scrofa domestica*), Luận văn Thạc sỹ sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM (2003).
- [13]. N.T. Thoa, L.N. Anh, V.T. Hương, T.S. Hà, D.V. Hương, N.T. Hương, Kết quả tạo phôi lợn trong ống nghiệm sử dụng môi trường NCSU37 + 10 % pFF, *Tap chí Khoa học Công nghệ Chăn nuôi*, 19, 34-40 (2009).