

## **PHÂN TÁCH TẾ BÀO CUMULUS CỦA TRỨNG ĐÊ BẰNG CÁCH SỬ DỤNG ENZYM HYALURONIDAZA**

### **Removing the Cumulus Cells of Caprine Oocytes by Using Hyaluronidase Enzyme**

**Nguyễn Hữu Đức<sup>1</sup>, Giang Hoàng Hà<sup>2</sup>, Trần Thị Bình Nguyễn<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Khoa Công nghệ sinh học, Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội*

<sup>2</sup>*Khoa Chăn nuôi và Nuôi trồng thủy sản, Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội*

Địa chỉ email tác giả liên hệ: [nhduc@hua.edu.vn](mailto:nhduc@hua.edu.vn)

Ngày gửi đăng: 27.04.2011; Ngày chấp nhận: 25.07.2011

#### **TÓM TẮT**

Nghiên cứu này được thực hiện nhằm xác định phương pháp thích hợp trong việc phân tách lớp tế bào cumulus của trứng dê thông qua việc sử dụng enzym hyaluronidaza. Trứng dê được nuôi thành thực trong môi trường TCM-199 đã bổ sung 0,25 mM natri pyruvate, 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS), 0,05 µg/m follicle stimulating hormone (FSH), 05 µg/ml luteinizing hormone, 01 µg/ml estradiol, 39°C, 5% CO<sub>2</sub>, khí bão hòa hơi nước trong 32 giờ. Sau đó, trứng thành thực được chuyển sang môi trường TCM-199Hepes với các điều kiện khác nhau về a) Nồng độ enzym hyaluronidaza (0,2 mg/ml; 0,5 mg/ml; 1 mg/ml; 1,5 mg/ml); b) Nhiệt độ môi trường (32°C, 37°C, 40°C); c) Thời gian xử lý (30 giây, 60 giây, 90 giây, 120 giây, 180 giây). Hiệu quả tách hoàn toàn lớp tế bào cumulus bằng cách kết hợp sử dụng enzym hyaluronidaza và tách cơ học trong các khoảng thời gian 120 giây, 180 giây là thích hợp (85,25% và 86,79%), kết quả này cao hơn rõ rệt (P<0,05) so với tách trong khoảng thời gian 90 giây (43,14%). Kết luận, việc phân tách tế bào cumulus của trứng dê được thực hiện tốt nhất khi sử dụng enzym hyaluronidaza (1,0 mg/ml ; 37°C, 120 - 180 giây) kết hợp phương pháp tách cơ học (hút lên xuống bằng pipet thủy tinh có đường kính trong là 130 - 150 µm).

Từ khóa: Enzym hyaluronidaza, tế bào cumulus, trứng dê.

#### **SUMMARY**

This study was performed to determine a convenient method for removing the cumulus cells of caprine oocytes by using hyaluronidase enzyme. Caprine oocytes were matured in TCM-199 supplemented with 0.25 mM sodium pyruvate, 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS), 0.05 µg/m follicle stimulating hormone (FSH), 05 µg/ml luteinizing hormone, 01 µg/ml estradiol, 39°C, 5% CO<sub>2</sub> in humidified air for 32 hours. Subsequently, matured oocytes were transferred into TCM-199Hepes of differing conditions: a/ Hyaluronidase concentration (0.2; 0.5; 1.0 and 1.5 mg/ml); b/ Temperature of medium (32, 37 and 40°C); c/ Treatment time (30, 60, 90, 120 and 180 seconds). The efficiency of removing cumulus cells using hyaluronidase enzyme and pipeting for 120 seconds, 18 seconds were found convenient methods (85.25% and 86.79% respectively). These results were significantly higher (P<0.05) than those obtained when pipetting was carried out for 90 seconds (43.14%). In conclusion, the best conditions for removing the cumulus cells of matured caprine oocytes to be involved the use of hyaluronidase enzyme (1.0 mg/ml ; 37°C, 120 - 180 seconds) combined mechanically (by pipeting using glass capillary with 130 - 150 µm inner diameter).

Key words: Caprine oocyte, cumulus cell, hyaluronidase enzyme.

## 1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Công nghệ sinh học sinh sản đang từng bước thâm nhập và phát huy vai trò trong các nghiên cứu và ứng dụng tại Việt Nam. Trong 5 năm gần đây, chương trình Công nghệ sinh học do Bộ Nông nghiệp và Phát triển nông thôn chủ trì đã xây dựng một số đề tài theo hướng nhân giống vật nuôi bằng các kỹ thuật cao như thụ tinh ống nghiệm, hút trứng với sự trợ giúp của máy siêu âm (kỹ thuật OPU), đông lạnh tinh trùng và trứng... trên đối tượng vật nuôi là con bò.

Trên đối tượng con dê, hầu như chưa có đề tài nghiên cứu nào được triển khai theo hướng công nghệ tạo phôi trong ống nghiệm bằng phương pháp tiêm tinh trùng vào bào tương của trứng (Intracytoplasmic Sperm Injection), hoặc tạo phôi nhân bản, chuyển gen... mặc dù, theo một số nhà khoa học, con dê có tiềm năng rất lớn để có thể thực hiện các kỹ thuật nói trên (Amoah và cs., 1997; Galli và cs., 2001; Baldassarre và cs., 2002; Guo và cs., 2002; Chaves và cs., 2008; Garcia-Rosello và cs., 2009; Momena và cs., 2011). Để có thể bắt đầu thực hiện được các kỹ thuật vừa đề cập, cần phải có nguồn trứng dê có chất lượng tốt và được nuôi thành thực *in vitro* (Guo và cs., 2002). Sau đó, các trứng này được tách sạch lớp tế bào cumulus xung quanh bằng cách sử dụng enzym hyaluronidaza (Lan và cs., 2006; Garcia-Rosello, 2009).

Nhằm bước đầu xây dựng các kỹ thuật nền của việc tạo phôi bằng phương pháp vi tiêm tinh trùng vào bào tương của trứng cũng như công nghệ tạo phôi nhân bản, nghiên cứu này tập trung xem xét ảnh hưởng của enzym hyaluronidaza đến khả năng phân tách lớp tế bào cumulus ở các điều kiện khác nhau (nồng độ enzym sử dụng, nhiệt độ môi trường ủ enzym và trứng, thời gian xử lý) và xác định phương pháp thích hợp trong việc phân tách lớp tế bào cumulus của trứng dê thông qua việc sử dụng enzym hyaluronidase.

## 2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

Hóa chất và các môi trường sử dụng trong nghiên cứu này đều được cung cấp bởi Hãng Sigma-Aldrich Chemicals (Mỹ). Các môi trường sử dụng đều được lọc qua màng lọc vô trùng Millipore (Ireland) có kích thước lỗ 0,22  $\mu\text{m}$ .

### 2.1. Thu và bảo quản buồng trứng dê Cỏ

Buồng trứng được thu ngay khi con vật bị chết, rửa sạch 3 - 5 lần bằng dung dịch nước muối sinh lý 37°C. Sau đó, chúng được bảo quản và vận chuyển về phòng thí nghiệm trong môi trường phosphate buffered saline (PBS) 37°C.

Môi trường PBS có thành phần như sau (dung pha 01 lít): NaCl 8g, KCl 0,2 g, natri pyruvat 0,036 g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,15 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,2 g, Glucose 01 g, MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O 0,1 g, CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 0,1 g, penicilin 100.000 đơn vị, streptomycin 0,05 g, bovine serum albumin 04 g.

### 2.2. Thu trứng bằng phương pháp hút trực tiếp

Buồng trứng về đến phòng thí nghiệm được rửa lại 04 lần bằng môi trường PBS ở 37°C. Dùng bơm tiêm loại 5 ml chọc hút trực tiếp các nang trên bề mặt buồng trứng. Phần hút ra gồm dịch nang, trứng và các loại tế bào khác được chuyển vào đĩa NUNC (đường kính 35 mm) có chứa môi trường TCM-199 Hepes đã bổ sung 5% fetal bovine serum (FBS) và kháng sinh penicilin (100.000 đơn vị/lít), streptomycin (0,05 g/lít).

Đĩa NUNC nói trên được đặt lên kính hiển vi Nikon SMZ1000 (có bàn ấm 37°C) và soi tìm trứng ở độ phóng đại 20 - 80 lần. Trứng tìm thấy sẽ được chuyển sang đĩa NUNC khác có chứa môi trường TCM-199 Hepes. Toàn bộ quá trình thao tác trên được thực hiện trong tủ hút vô trùng Labconco.

### 2.3. Nuôi thành thực trứng *in vitro*

Phương pháp nuôi thành thực trứng trong nghiên cứu này dựa vào phương pháp của Izquierdo và cs. (2002) có cải tiến.

Trứng sau khi được rửa qua 04 đĩa NUNC có chứa môi trường TCM-199 Hepes, chúng được chuyển vào giọt nuôi (50l) có chứa môi trường TCM-199 đã bổ sung 0,25 mM natri pyruvate, 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS), 0,05 g/ml follicle stimulating hormone (FSH), 05 g/ml luteinizing hormone, 01 g/ml estradiol.

Các giọt nuôi trứng nói trên được phủ dầu khoáng (Sigma - M8410) và cân bằng trong tủ nuôi có điều chỉnh 39°C, 5% CO<sub>2</sub>, khí bão hòa hơi nước trước khi dùng từ 1 - 2 giờ.

Thời gian nuôi trứng trong điều kiện tủ nuôi như trên kéo dài 32 giờ. Sau đó, trứng được lấy ra khỏi môi trường nuôi và chuyển vào môi trường TCM-199Hepes để tiến hành các thao tác tách tế bào cumulus tiếp theo.

#### **2.4. Sử dụng enzym hyaluronidaza để phân tách lớp tế bào cumulus**

Trứng sau nuôi thành thực 32 giờ, chuyển sang môi trường TCM199-Hepes với các điều kiện khác nhau về:

\* *Nồng độ enzym hyaluronidaza:*

Trứng dê sau nuôi thành thực được chuyển vào môi trường TCM199-Hepes đã bổ sung enzym hyaluronidaza với các nồng độ khác nhau (0,2 mg/ml; 0,5 mg/ml; 1 mg/ml; 1,5 mg/ml), sau thời gian 10 phút, quan sát sự phân rã của các lớp tế bào cumulus bao quanh trứng trên kính hiển vi soi nổi Nikon SMZ1000.

\* *Nhiệt độ môi trường:*

Trứng dê sau nuôi thành thực được chuyển vào môi trường TCM-199 - Hepes có nồng độ enzym hyaluronidaza là 0,5 mg/ml và 1 mg/ml, mỗi nồng độ sẽ được khảo sát tương ứng với 03 mốc nhiệt độ (32°C, 37°C, 40°C).

Nhiệt độ môi trường được điều chỉnh chính xác bằng cách đặt đĩa NUNC chứa trứng và môi trường lên trên bàn ấm Minitub (Đức), đậy nắp kín. Thời gian lưu

trứng trong môi trường TCM-199-Hepes có bổ sung enzym hyaluronidase là 05 phút.

\* *Thời gian xử lý:* 30 giây, 60 giây, 90 giây, 120 giây, 180 giây.

Đặt trứng đã nuôi thành thực vào môi trường TCM-199 Hepes có bổ sung enzym hyaluronidaza trong các khoảng thời gian rút ngắn (30 giây, 60 giây, 90 giây, 120 giây, 180 giây), nhiệt độ 37°C, kết hợp dùng pipet thủy tinh có đường kính trong là 130 - 150 µm để tách sạch lớp tế bào cumulus bao quanh.

\* *Mức độ tác động của enzym hyaluronidaza* được đánh giá bằng số lớp tế bào cumulus còn lại bao quanh trứng.

#### **2.5. Xử lý số liệu**

Số liệu được xử lý bằng phần mềm Microsoft Excel.

### **3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN**

#### **3.1. Ảnh hưởng của nồng độ enzym hyaluronidaza**

Enzym hyaluronidaza có tác dụng phân giải mối liên kết giữa các tế bào cumulus bao quanh trứng, enzym này có mặt trong thể đỉnh của tinh trùng và phát huy tác dụng cùng với hai enzym khác là zona lizin và muraminidaza khi xảy ra quá trình thụ tinh.

Enzym hyaluronidaza được sử dụng trong các nghiên cứu dưới đây có nguồn gốc từ tinh hoàn của bò (Type I-S), là sản phẩm thương mại hóa của Sigma-Aldrich mà nhiều phòng thí nghiệm sử dụng trong quá trình phân tách lớp tế bào cumulus (Izquierdo và cs., 2002; Lan và cs., 2006; Garcia-Roselló và cs., 2009; Momena và cs., 2011).

Mức độ tác động gây phân rã lớp tế bào cumulus của enzym hyaluronidaza trong thí nghiệm của nghiên cứu này được trình bày ở bảng 1.

**Bảng 1. Mức độ phân rã của lớp tế bào cumulus trong TCM199-Hepes có nồng độ enzym hyaluronidaza khác nhau**

Lô thí nghiệm	Số trứng (n)	Mức độ phân rã của lớp tế bào cumulus trong TCM199-Hepes có nồng độ enzym hyaluronidaza (mg/ml) tương ứng			
		0,2	0,5	1,0	1,5
1	25	+	++	++	+++
2	37	-	+	++	++
3	42	-	+	+	++
4	38	+	++	+++	+++
5	51	-	+	++	++
6	20	-	+	++	++
Tổng số	213				

Ghi chú: (+) : còn 70-90% lớp tế bào cumulus; (++) : còn 30-70% lớp tế bào cumulus; (+++): còn 10-30% lớp tế bào cumulus; (-): các lớp tế bào cumulus hầu như không thay đổi

**Bảng 2. Mức độ phân rã của lớp tế bào cumulus trong TCM-199 Hepes có bổ sung enzym hyaluronidaza tại các nhiệt độ khác nhau**

Nồng độ hyaluronidaza (mg/ml)	Số trứng (n)	Mức độ phân rã của lớp tế bào cumulus trong TCM199-Hepes có bổ sung enzym hyaluronidaza tại các nhiệt độ tương ứng		
		32°C	37°C	40°C
0,5	82	++	++	+++
1,0	78	++	+++	+++

Kết quả ở bảng 1 cho thấy, enzym hyaluronidaza bắt đầu phát huy hoạt tính phân giải liên kết giữa các tế bào cumulus bao quanh trứng ở nồng độ bắt đầu từ 0,5 mg/ml. Nồng độ enzym hyaluronidaza là 1,0 mg/ml cho kết quả rõ rệt. Điều này phù hợp với kết quả mà Garcia và cs. (2009) thu nhận khi tách tế bào cumulus trong các thí nghiệm tiêm tinh trùng vào bào tương của trứng.

Tuy nhiên, thời gian 10 phút lưu trứng ngoài tử nuôi là không có lợi cho sự phát triển của trứng về sau, do vậy, nghiên cứu này tìm cách nâng nhiệt độ môi trường lên (trong thí nghiệm 02 dưới đây) để tạo điều kiện cho enzym hyaluronidaza phát huy tác dụng nhanh hơn.

### 3.2. Ảnh hưởng của nhiệt độ môi trường

Nhiệt độ môi trường có ảnh hưởng đến hoạt tính của enzym. Trong trường hợp sử dụng hyaluronidaza, 03 mức nhiệt độ khác nhau đã được chọn và enzym hyaluronidaza phát huy tác dụng tương đối tốt (tương ứng với dấu ++) khi nhiệt độ môi trường tăng dần từ 32°C đến 40°C (Bảng 2).

Trong dải nhiệt độ trên, 37°C là nhiệt độ được quan tâm hơn vì đây là nhiệt độ bình thường của cơ thể, tác động của enzym hyaluronidaza thấy rõ nhất với nồng độ 1,0 mg/ml. Hơn nữa, thời gian lưu trứng trong môi trường TCM-199 Hepes đã giảm (từ 10 phút xuống còn 05 phút). Điều này có ảnh hưởng dương tính đến sức sống của trứng dùng cho các mục đích khác về sau.

Kết quả của nghiên cứu này phù hợp với kết luận của Lan và cs. (2006) khi thực hiện việc phân tách tế bào cumulus để thực hiện việc tạo phôi dê nhân bản.

### 3.3. Ảnh hưởng của thời gian xử lý với enzym hyaluronidase

Enzym hyaluronidaza đã được sử dụng ở nồng độ 1,0 mg/ml và 37°C. Tuy nhiên, thời gian lưu mẫu 05 phút ngoài tử nuôi, cần được rút ngắn hơn nữa bằng cách thực hiện việc phân tách tế bào cumulus trong môi trường có chứa enzym hyaluronidaza đồng thời với việc dùng pipet thủy tinh như một biện pháp can thiệp cơ học hỗ trợ (Bảng 3).

**Bảng 3. Hiệu quả tách hoàn toàn lớp tế bào cumulus bằng cách kết hợp sử dụng enzym hyaluronidaza và tách cơ học trong các khoảng thời gian khác nhau**

Lô thí nghiệm	Số trứng (n)	Khả năng tách hoàn toàn lớp tế bào cumulus bằng cách kết hợp sử dụng enzym hyaluronidaza và tách cơ học trong các khoảng thời gian khác nhau (%)				
		30 giây	60 giây	90 giây	120 giây	180 giây
1	120	0/08	4/23	10/26	30/36	24/27
2	106	0/09	3/21	12/25	22/25	22/26
Tổng cộng	226	(0)	(15,91) <sup>c</sup>	(43,14) <sup>b</sup>	(85,25) <sup>a</sup>	(86,79) <sup>a</sup>
		0/17	7/44	22/51	52/61	46/53

Các chữ <sup>a, b, c</sup>: Sai khác thống kê rõ rệt ( $P < 0,01$ )

Số liệu bảng 3 cho thấy khoảng thời gian thích hợp để phương pháp nói trên phát huy tác dụng tách sạch lớp tế bào cumulus của phần lớn các trứng là từ 120 giây đến 180 giây. Như vậy, quá trình tách lớp tế bào cumulus đã được giảm đáng kể (từ 05 phút xuống còn 2-3 phút), điều này có ảnh hưởng tốt đến sức sống của trứng về sau.

Tuy nhiên, trong phương pháp tách kết hợp này, tay nghề của người thao tác rất ảnh hưởng đến chất lượng của trứng. Việc hút trứng lên xuống bằng pipet thủy tinh phải được tiến hành hết sức nhẹ nhàng, làm từng trứng một và luôn quan sát quá trình này trên kính hiển vi soi nổi.

Kết quả tách tế bào cumulus được thực hiện trong nghiên cứu này phù hợp với kết quả của nhiều tác giả trên thế giới khi thực hiện trên trứng các giống dê khác nhau cho mục đích tạo phôi thụ tinh ống nghiệm, vi tiêm tinh trùng vào bào tương của trứng (ICSI), tạo phôi nhân bản hoặc chuyển gen (Martino và cs., 1995; Izquierdo và cs., 2002; Lan và cs., 2006; García-Roselló và cs., 2009; Momena và cs., 2011).

#### 4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu đã xây dựng thành công phương pháp tách hoàn toàn lớp tế bào cumulus của trứng dê sau nuôi thành thực bằng việc sử dụng enzym hyaluronidaza (1,0 mg/ml; 37°C, 120-180 giây) kết hợp phương

pháp tách cơ học (hút lên xuống bằng pipet thủy tinh có đường kính trong là 130-150 m).

#### Lời cảm ơn

Nghiên cứu này được thực hiện với sự hỗ trợ kinh phí từ 02 đề tài cấp Trường Đại học Nông nghiệp Hà Nội (mã số T2010-12-27 và TTRIG2009-12-54). Nhóm tác giả xin chân thành cảm ơn vì sự giúp đỡ nói trên.

#### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Amoah EA, S. Gelaye (1997). Biotechnological advances in goat reproduction. *J Anim Sci.*, 75(2): 578-85.
- Baldassarre H, B.Wang, N.Kafidi, C.Keefer, A.Lazaris, C.N.Karatzas (2002). Advances in the production and propagation of transgenic goats using laparoscopic ovum pick-up and *in vitro* embryo production technologies. *Theriogenology*, 57(1): 275-84.
- Chaves RN, FS. Martins, MV. Saraiva, JJ. Celestino, CA. Lopes, JC. Correia, IB. Verde, MH. Matos, SN. Baos, KP. Name, CC. Campello, JR. Silva, JR. Figueiredo (2008). Chilling ovarian fragments during transportation improves viability and growth of goat preantral follicles cultured *in vitro*. *Reprod Fertil Dev.*, 20(5): 640-7.
- Galli C, G. Crotti, C. Notari, P. Turini, R. Duchi, G. Lazzari (2001). Embryo production by ovum pick up from live donors. *Theriogenology*, 5(6):1341-57.

- García-Roselló E, E. García-Mengual, P. Coy, J. Alfonso, MA. Silvestre (2009). Intracytoplasmic sperm injection in livestock species: an update. *Reprod Domest Anim.*, 44(1): 143-51.
- Guo J, Z. An, Y. Li, X. Li, Y. Li, Z. Guo, Y. Zhang (2002). Cloned goats (*Capra hircus*) from adult ear cells. *Sci China C Life Sci.*, 45(3): 260-7.
- Izquierdo D, P. Villamediana, M. López-Bejar, MT. Paramio (2002). Effect of *in vitro* and *in vivo* culture on embryo development from prepubertal goat IVM-IVF oocytes. *Theriogenology*, 57(5): 1431-41.
- Lan G.C., Z.L. Chang, M.J. Luo, Y.L. Jiang, D. Han, Y.G. Wu, Z.B. Han, S.F. Ma, J.H. Tan (2006). Production of cloned goats by nuclear transfer of cumulus cells and long-term cultured fetal fibroblast cells into abattoir-derived oocytes. *Mol Reprod Dev.* 73(7): 834-40.
- Martino A, T. Mogas, M.J. Palomo, M.T. Paramio (1995). *In vitro* maturation and fertilization of prepubertal goat oocytes. *Theriogenology*, 43(2):473-85.
- Momena Khatun, Mohammad Musharraf Uddin Bhuiyan, Jalal Uddin Ahmed, Aminul Haque, Mohammad Bozlur Rahman, Mohammed Shamsuddin (2011). *In vitro* maturation and fertilization of prepubertal and pubertal black Bengal goat oocytes. *J Vet Sci.*, 12(1): 75–82.