

NGHIÊN CỨU TẠO CHUỘT CHUYỂN GEN EGFP BẰNG PHƯƠNG PHÁP VI TIÊM

Phan Ngọc Uyên Phương^{1,2*}, Lê Bảo Thơ³, Nguyễn Thị Huỳnh Như⁴, Nguyễn Thị Lệ Giang⁵, Nguyễn Đăng Quân¹, Dương Hoa Xô¹, Nguyễn Trọng Bình¹

¹ Trung tâm Công nghệ sinh học Thành phố Hồ Chí Minh

² Trường Đại học Bách Khoa Thành phố Hồ Chí Minh

³ Trường Đại học Văn Lang

⁴ Trường Đại học Tôn Đức Thắng

⁵ Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh

TÓM TẮT

Chuột chuyển gen có tiềm năng to lớn trong các nghiên cứu khoa học cũng như ứng dụng, đặc biệt là trong lĩnh vực y sinh học. Mặc dù chuột chuyển gen đã được tạo ra và ứng dụng rộng rãi ở nhiều quốc gia trên thế giới, một số nghiên cứu tạo phôi chuột chuyển gen đã được nghiên cứu và thành công ở Việt Nam. Tuy nhiên để tạo được chuột chuyển gen cần phải thực hiện bước cấy phôi chuyển gen vào chuột mẹ mang thai hộ. Vì vậy, nghiên cứu tối ưu bước cấy chuyển phôi góp phần tăng hiệu quả của quá trình tạo chuột biến đổi di truyền. Chuột cái cho phôi được gây siêu bài noãn bằng 5 IU PMSG sau 24 giờ tiến hành tiêm 5 IU hCG và ghép đực cho giao phối. Sau 24 giờ tiến hành giết chuột cái để thu nhận hợp tử giai đoạn hai tiền nhân. Gen *egfp* được chuyển vào hợp tử bằng phương pháp vi tiêm. Chuột đực thí tinh được bắt thụ bằng phương pháp cắt ống dẫn tinh. Chuột nhận phôi được xác định giai đoạn động dục và ghép đôi với chuột đực bắt thụ. Những chuột có dấu hiệu giao phối thành công sẽ được cấy phôi bằng phương pháp phẫu thuật mở lưng tại đoạn bóng (ampulla) ở ống dẫn trứng. Kết quả cho thấy chuột đực bắt thụ đạt tỷ lệ 80%. Tỷ lệ tương quan của hai phương pháp xác định giai đoạn động dục là 100%. Các chuột cái ở giai đoạn động dục được giao phối với chuột đực bắt thụ với tỷ lệ giao phối thành công của việc tạo chuột mang thai giả là 81,67%. 100% chuột nhận phôi có dấu hiệu mang thai. Nghiên cứu này của chúng tôi cho thấy tiềm năng ứng dụng rất lớn trong việc tạo chuột biến đổi gen nhằm phục vụ các nghiên cứu khoa học trong tương lai.

Từ khóa: Chuột cái mang thai hộ, chuột động dục, chuột đực bắt thụ, chuyển phôi, chuột phát sáng huỳnh quang.

MỞ ĐẦU

Để tạo ra được mô hình động vật mang gen ngoại lai nhằm ứng dụng trong các nghiên cứu y sinh học, ngoài việc sàng lọc các phôi mang gen thì việc chuyển phôi mang gen vào chuột mẹ mang thai hộ là một trong các bước cực kì quan trọng. Chuột chuyển gen phát sáng huỳnh quang có thể ứng dụng trong việc tạo nguồn tế bào mang gen *egfp* phục vụ cho các nghiên cứu y sinh học (Okabe *et al.*, 1997). Modzelewski và đồng tác giả (2018) thông báo về hiệu quả của việc chỉnh sửa gen bằng kỹ thuật Crispr-EZ mô tả việc tạo chuột biến đổi gen bằng việc vi tiêm DNA vào hợp tử giai đoạn hai tiền nhân và chuyển phôi vào ống dẫn trứng chuột cái mang thai hộ nhằm sinh chuột con được chỉnh sửa gen. Carson và đồng tác giả năm 2000 đã báo cáo rằng, việc chuyển phôi vào chuột mẹ mang thai hộ là một bước thiết yếu trong quá trình tạo chuột biến đổi gen (Carson *et al.*, 2000). Chuyển phôi vào chuột mẹ mang thai hộ có thể được thực hiện bằng nhiều phương pháp khác nhau. Một số nghiên cứu ở Việt Nam đã thành công trong việc tạo phôi mang gen phát sáng huỳnh quang, tuy nhiên để có được chuột chuyển gen cần phải chuyển phôi vào chuột mẹ mang thai hộ. Việc cấy chuyển phôi vào sừng tử cung chuột mẹ mang thai hộ sử dụng phôi giai đoạn morula hoặc blastocyst, trong khi đó, các phôi giai đoạn tiền làm tổ từ giai đoạn 1 tế bào phát triển từ trong cơ thể chuột luôn là tốt nhất, do đó phôi được chuyển nên ở giai đoạn 1-2 tế bào thay vì giai đoạn muộn hơn. Nghiên cứu của các nhà khoa học trên thế giới về việc ứng dụng hệ thống CRISPR - Cas9 trong việc chỉnh sửa gen, vi tiêm vào phôi giai đoạn 2 tế bào và chuyển phôi vào ống dẫn trứng (Ittner, 2007), (Mizuno *et al.*, 2014), (González-Jara *et al.*, 2017), (Modzelewski *et al.*, 2018), (Wu *et al.*, 2019). Trong nghiên cứu này, chúng tôi thực hiện cấy chuyển phôi mang gen vào ống dẫn trứng chuột mẹ mang thai hộ sau vi tiêm DNA ở giai đoạn 1-2 tế bào trên đối tượng chuột ICR, đây là đối tượng chuột phổ biến ở Việt Nam, do đó tiềm năng ứng dụng là rất lớn đối với các nghiên cứu khoa học cũng như y sinh học trong nước.

NGUYÊN VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Nguyên vật liệu

Chuột cái và chuột đực *Mus musculus* var. *albino* (ICR) trưởng thành về mặt sinh dục có cân nặng từ 25 - 35 g được nuôi ở nhiệt độ 22 - 25°C, thức ăn và nước uống được cung cấp tự do, chu kỳ chiếu sáng là 12h sáng 12h tối. Vector PCX-EGFP được cung cấp bởi Khu nuôi động vật thử nghiệm - Trường Đại học Tsukuba - Nhật Bản.

Chuẩn bị chuột đực bất thụ bằng phương pháp cắt ống dẫn tinh

Gây mê chuột đực hữu thụ bằng việc tiêm phúc mạc bụng (i.p.) bằng thuốc gây mê. Chuột đực được gây mê hoàn toàn, tạo một vết rạch nhỏ vuông góc với hướng của đuôi, kéo đệm mỡ sinh dục có ống dẫn tinh ra ngoài, dùng kẹp được đốt nóng trên ngọn lửa đèn cồn kẹp chặt vào ống dẫn tinh sao cho cắt một đoạn ống dẫn tinh dài khoảng 5 mm sao cho có thể tách đoạn ống dẫn tinh thành hai phần và không chảy máu. Nhẹ nhàng đẩy toàn bộ ống dẫn tinh và đệm mỡ sinh dục trở lại bên trong ổ bụng như ban đầu. Làm tương tự với ống dẫn tinh ở phía còn lại. Khâu vết mổ lần lượt từ cơ đến da bằng chỉ phẫu thuật 4.0, đưa chuột trở lại buồng nuôi và theo dõi sự hồi phục của chuột. Chuột đực bất thụ phải được theo dõi trong vòng ít nhất 10 - 14 ngày trước khi giao phối, nếu chuột cái có dấu hiệu giao phối mà không có dấu hiệu mang thai sau ít nhất 1 tuần ghép đôi, thì chuột đực bất thụ được đánh giá đạt yêu cầu.

Phương pháp

Chuẩn bị DNA

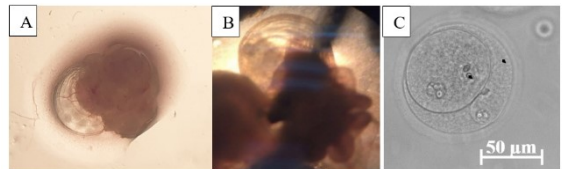
Plasmid PCX-EGFP được biến nạp vào tế bào khả nạp *E. Coli* DH5α với yếu tố chọn lọc là kháng sinh ampiciline với nồng độ 100 µg/ml. Tách chiết, tinh sạch plasmid bằng GenJet Plasmid miniprep kit Thermo Scientific™, Mỹ. Plasmid sau khi tinh sạch được kiểm tra nồng độ và kiểm tra độ tinh sạch bằng OD260/280 nằm trong khoảng 1,8 - 2,0 (Hassanane *et al.*, 2017) bằng máy đo NanoDrop OneC (Model: ND-OneC). Để kiểm tra lại cấu trúc Plasmid, 10 µg ADN Plasmid PCX-EGFP được cắt bởi enzyme cắt giới hạn là Sall và BamHI để thu nhận đoạn *egfp* và promotor (Ikawa *et al.*, 1995). Đoạn DNA này được điện di trên gel với kích thước là 3180 bp. Để kiểm tra sự hoạt động của vector mang gen *egfp*, chúng tôi tiến hành chuyển nạp plasmid PCX-EGFP vào tế bào HEK293T. Sau 24h chuyển nạp, ghi nhận sự phát sáng màu xanh lục của tế bào HEK293T dưới kính hiển vi huỳnh quang (Mizuno *et al.*, 2014).

Xác định giai đoạn động dục ở chuột cái nhận phôi

Chuột cái được quan sát trực quan âm hộ và có biểu hiện ít ẩm ướt, màu hồng, âm hộ mở rộng, Tiến hành đánh giá trạng thái tế bào bằng cách tạo huyền phù dung dịch muối sinh lý 0.9 % với dịch âm đạo, sau đó phết lên phiến kính và để khô trong không khí. Nhuộm vết phết tế bào với xanh methylene 1% trong 45 giây và quan sát dưới kính hiển vi. Những chuột có sự hiện diện của tế bào biểu mô sừng hóa không nhân được xác định là đang ở giai đoạn động dục. Tuy nhiên, do bị tác động đến cơ quan sinh sản nên những chuột cái sử dụng phương pháp đánh giá tế bào không được dùng làm chuột nhận phôi. Phương pháp đánh giá vết phết tế bào âm đạo được xem như là đối chứng để đánh giá chuột động dục bằng phương pháp quan sát trực quan âm hộ để chọn chuột nhận phôi.

Thu nhận hợp tử giai đoạn hai tiền nhân

Thu nhận hợp tử giai đoạn hai tiền nhân được thực hiện theo Mizuno và đồng tác giả, (2014), Wu và đồng tác giả (2019). Chuột cái khỏe mạnh, trưởng thành về mặt sinh dục được gây siêu bài hoãn bằng 5 IU PMSG và 5 IU hCG sau 46 - 48 giờ. Sau đó chuột đực được nhốt với chuột đực hữu thụ và kiểm tra nút nhầy âm đạo ở ngày tiếp theo, Mổ chuột và thu nhận đoạn ống dẫn trứng chứa hợp tử giai đoạn hai tiền nhân để chuẩn bị cho quá trình vi tiêm *egfp*.



Hình 1. Vị trí ống dẫn trứng với sự hiện diện trứng trưởng thành hoặc hợp tử giai đoạn hai tiền nhân
 A: Ống dẫn trứng. B: Tử cung - ống dẫn trứng - buồng trứng. C: Hợp tử giai đoạn hai tiền nhân

Vi tiêm ADN vào hợp tử giai đoạn hai tiền nhân

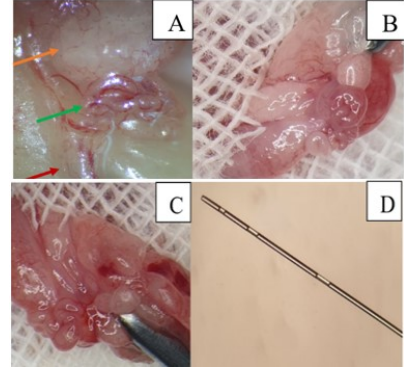
Nạp mẫu DNA vào microinjection pipet bằng microloader (2 ng/µl). Chuyển hợp tử vào đĩa chứa môi trường M2 được cố định trong ở giữa đĩa 35x10 mm hoặc chamber. Dùng holding pipet để giữ hợp tử sao cho thể cực ở vị trí 6h hoặc 12h và điều chỉnh hệ thống kính hiển vi thao tác sao cho có thể nhìn thấy dễ dàng hai tiền nhân. Đồng thời điều chỉnh kim vi tiêm sao cho ở hướng 3h, chuẩn bị cho quá trình vi tiêm DNA vào hợp tử. Khi vi tiêm ADN vào tiền nhân đực, có thể dễ dàng quan sát được kích thước của tiền nhân đực lớn hơn ban đầu hoặc có sự xáo trộn của các hạch nhân bên trong tiền nhân, sau đó nhẹ nhàng rút kim vi tiêm ra khỏi hợp tử. Dùng holding pipet nhả hợp tử ra đĩa và tiếp tục với các hợp tử khác. Sau khi thực hiện thao tác vi tiêm, chuyển hợp tử vào đĩa môi trường KSOM đã chuẩn bị trước đó, nuôi trong điều kiện 37° C, 5% CO₂ cho tới khi cấy chuyển phôi.



Hình 2. Vi tiêm vector mang gen *egfp* vào hợp tử giai đoạn hai tiền nhân

Chuyển phôi giai đoạn 1 - 2 tế bào vào tử cung chuột cái mang thai hộ

Chuột cái sau khi được kiểm tra nút nhầy âm đạo và có dấu hiệu giao phối thành công sẽ được chọn để phẫu thuật mở lưng kiểm tra ống dẫn trứng. Chuột cái được gây mê hoàn toàn, tạo một vết rạch ở vùng da và cơ của phía lưng chuột cái sao cho có thể kéo đệm mỡ sinh dục - đoạn buồng trứng - ống dẫn trứng ra ngoài và lột trên gác võ trùng, tìm vị trí ampulla cho quá trình chuyển phôi dưới kính hiển vi soi nổi. Tùy theo phôi được chuyển mà có vị trí chuyển phôi thích hợp. Trong nghiên cứu này, những chuột có ống dẫn trứng xuất hiện ampulla sẽ được tiến hành chuyển phôi ở giai đoạn hai tế bào. Dùng kéo vi phẫu thuật chuyên dụng tạo một lỗ nhỏ ở vị trí trước ampulla, sau đó chuyển phôi từ kim chuyển phôi vào ống dẫn trứng sao cho có sự hiện diện của bong bóng khí (10 - 12 phôi/ vị trí). Lưu ý, khi tạo kim chuyển phôi phải tạo đoạn môi trường - không khí đan xen nhau để giữ phôi trong kim chuyển phôi và khi chuyển phôi vào ống dẫn trứng để có thể đảm bảo phôi không bị thoát ra ngoài. Sau khi chuyển phôi xong, nhẹ nhàng đưa toàn bộ đoạn ống dẫn trứng - buồng trứng - tử cung trở lại ổ bụng, tiếp tục làm tương tự với vị trí còn lại. Sau đó khâu vết mổ và đưa chuột trở lại buồng nuôi, theo dõi sự hồi phục của chuột cho đến ngày chuột sinh con non.



Hình 3. Ống dẫn trứng chuột cái.
 A: không có ampulla. B: có ampulla. C: sau khi được chuyển phôi với sự hiện diện của bong bóng khí bên trong. D: Kim chuyển phôi với sự đan xen của các đoạn môi trường - không khí - môi trường (đường kính đầu kim chuyển phôi có kích thước 10 - 12 mm)

Phương pháp theo dõi và chăm sóc chuột cấy phôi

Quá trình chuyển phôi vào ống dẫn trứng của chuột nhận được thực hiện thông qua việc xác định giai đoạn động dục ở chuột cái bằng quan sát trực quan âm hộ với các biểu hiện đặc trưng của âm hộ như sưng, mở rộng, sau đó giao phối với chuột đực bất thụ. Chuột cái sau giao phối với sự hiện diện của nút nhầy âm đạo (+) và đoạn bóng (ampulla) ở ống dẫn trứng chuẩn bị cho quá trình tiếp nhận phôi. Các phôi sau khi vi tiêm ADN được chuyển vào ống dẫn trứng và chuột mẹ sinh con non sau 19±3 ngày mang thai. Chuột con sinh ra được kiểm tra dưới ánh sáng kích thích với biểu hiện phát sáng huỳnh quang.

Kiểm tra chuột con sinh ra mang gen

Chuột con sinh ra được kiểm tra dưới ánh sáng kích thích 430 - 530 nm. Với các chuột được chuyển phôi có sự xuất hiện của sự biểu hiện huỳnh quang xanh được cho là thành công của quá trình chuyển phôi vào chuột mang thai hộ và điều này chứng minh sự khác nhau về mặt huyết thống của chuột cái mang thai hộ và chuột con sinh ra.

KẾT QUẢ

Tạo chuột đực bất thụ

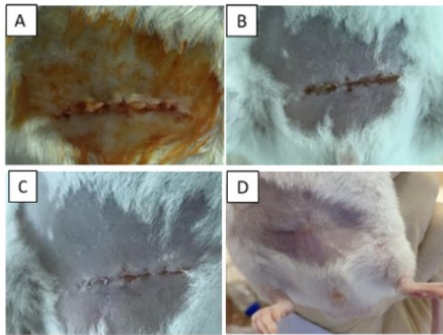
Trong 15 con chuột được nêu ở bảng 1 (8 - 10 tuần tuổi - trưởng thành về mặt sinh dục, khỏe mạnh, hai tinh hoàn đều), được phẫu thuật cắt ống dẫn tinh, ghi nhận được 12 con chuột đực còn sống, khỏe mạnh, sinh hoạt bình thường, không viêm nhiễm và không làm cho chuột cái mang thai sau khi ghép ít nhất một tuần. Hai chuột đực không ghi nhận được kết quả do bị sốc trong quá trình gây mê hoặc mất máu do quá trình phẫu thuật cắt ống dẫn tinh kéo dài hơn 30 phút (không tỉnh dậy sau khi phẫu thuật - được kiểm tra sau 1 đêm) và một chuột đực bị nhiễm trùng vết thương sau phẫu thuật. Như vậy ghi nhận được 80% ± 16.33 (bảng 1) chuột đực được tạo ra bằng phương pháp cắt ống dẫn tinh. Chuột đực bất thụ sẽ được tái sử dụng nhiều lần. Trong trường hợp chuột đực bất thụ liên tiếp không giao phối thành công với chuột cái để tạo hiện tượng mang thai giả thì sẽ được ghi nhận vào phiếu theo dõi, với tỷ lệ giao phối không thành công (> 4/7) lần liên tiếp thì sẽ bị loại bỏ để tạo chuột đực bất thụ mới.

So sánh độ tương quan của phương pháp vết phết tế bào âm đạo và quan sát trực quan âm hộ ở chuột cái giai đoạn động dục.

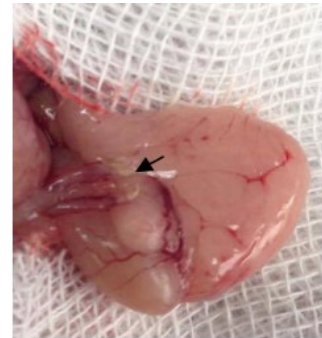
Cùng quan điểm với nhóm nghiên cứu, Justin D. Vidal cũng đã xác định chu kì động dục bằng phương pháp quan sát trực quan âm hộ và sau đó là bằng phương pháp vết phết tế bào âm đạo (Vidal và Filgo, 2017). Chuột mang thai hộ được tạo ra từ chuột giai đoạn động dục (Hishigami và đồng tác giả, (2006), Ittner (2007). Phương pháp xác định chu kì động dục đơn giản, ít chi phí và chính xác nhất trong việc xác định chu kì động dục là vết phết tế bào âm đạo với sự hiện diện của các loại tế bào đặc trưng, trong đó ở giai đoạn động dục là các tế bào biểu mô sừng hóa không nhân (hình 6b). Kết quả nghiên cứu của chúng tôi cho thấy trong 15 chuột đực sử dụng có âm đạo biểu hiện sưng rõ rệt, nhẵn, khô, âm hộ mở rộng và có màu sắc là hồng đều có vết phết tế bào âm đạo với sự hiện diện của tế bào biểu mô sừng hóa không nhân với tỷ lệ 100% (bảng 2). Nhóm nghiên cứu đã sử dụng sự tương đồng này để làm phương pháp sàng lọc chuột ở giai đoạn động dục cho quá trình tạo chuột cái mang thai hộ.

Bảng 1. Tỷ lệ chuột đực bắt thụ được tạo nên bằng phương pháp cắt ống dẫn tinh

Lô TN	Số con/ lô	Độ tuổi (tuần)	Cân nặng (g)	Tỷ lệ chuột đực bắt thụ (%)
1	5	8 - 9	25 - 35 g	3/5
2	5	9 - 10	25 - 35 g	4/5
3	5	9 - 10	25 - 35 g	4/5



Hình 4. Sau 7 ngày, vết mổ hoàn toàn khép kín cùng với sự hoạt động bình thường trở lại của chuột đực sau khi cắt ống dẫn tinh
 A: Vết khâu ngay sau khi phẫu thuật cắt ống dẫn tinh. B: Vết khâu hồi phục sau 4 ngày. C: Vết khâu hồi phục sau 8 ngày. D: Vết khâu hồi phục hoàn toàn sau 14 ngày, miệng vết khâu khép kín hoàn toàn, không có dấu hiệu nhiễm trùng.



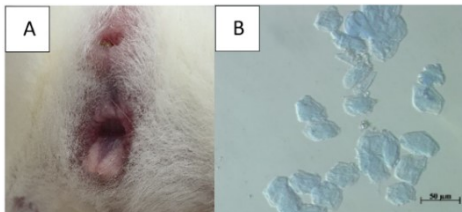
Hình 5. Ống dẫn tinh được cắt thành công bằng kẹp nhiệt (mũi tên màu đen cho thấy sự tách biệt rõ ràng của ống dẫn tinh và không gây chảy máu)

Sự hoạt động của egfp

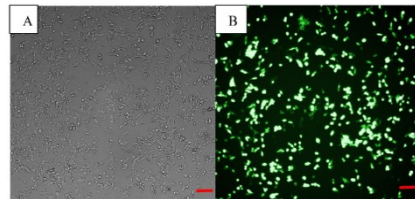
Sau 24h kể từ lúc chuyển nạp *egfp*, tế bào HEK293T phát sáng dưới kính hiển vi huỳnh quang (hình 7). Điều này chứng minh sự hoạt động của *egfp* là bình thường. Vì vậy, *egfp* sẽ được chúng tôi sử dụng như là một dấu hiệu để vi tiêm vào hợp tử giai đoạn hai tiền nhân.

Hợp tử giai đoạn hai tiền nhân cho quá trình vi tiêm và chuyển phôi

Hợp tử giai đoạn hai tiền nhân được chuẩn bị cho quá trình vi tiêm vector mang gen *egfp* vào tiền nhân đực nhằm tạo chuột phát sáng huỳnh quang như một dấu hiệu để kiểm tra sự khác nhau về mặt huyết thống với chuột mẹ nhận phôi.



Hình 6. Âm hộ chuột cái và vết phết tế bào âm đạo
 A. Âm hộ chuột cái giai đoạn động dục. B. Tế bào biểu mô sừng hóa không nhân

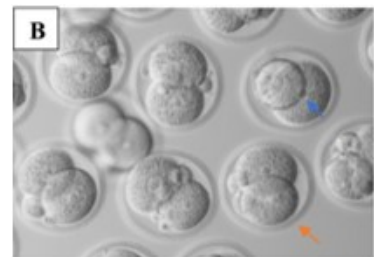


Hình 7. Biểu hiện phát sáng huỳnh quang của tế bào HEK293T
 A. Ảnh sáng trắng. B. Ảnh sáng kích thích

Bảng 2. Số hợp tử thu nhận sử dụng cho quá trình vi tiêm egfp

Lô TN	Số chuột sử dụng	Số phôi thu nhận được	Số phôi được vi tiêm	Số phôi được chuyển phôi sau vi tiêm
1	4	132	110	79
1	7	227	224	204

Bảng 2 cho thấy với liều tiêm hormone PMSG, hCG là 5 IU thì nhóm nghiên cứu thu nhận được trung bình 32, 64 hợp tử giai đoạn hai tiền nhân (359/11). Đối với các chuột ở độ tuổi sinh sản bình thường sẽ cho 8 - 12 chuột con/ lần sinh sản. Như vậy kết quả thu nhận hợp tử như trên hoàn toàn đáng ghi nhận cho việc tối thiểu hóa số động vật sử dụng. Các phôi sau khi vi tiêm được đánh giá sự sinh trưởng và phát triển, sau đó chuyển phôi vào chuột mẹ mang thai hộ. Trong nghiên cứu này, với quy trình thực hiện như trên, chúng tôi ghi nhận dấu hiệu thụ tinh được thể hiện bằng sự hiện diện của hợp tử giai đoạn hai tiền nhân hoặc có sự xuất hiện của hai



Hình 4. Phôi giai đoạn 2 tế bào

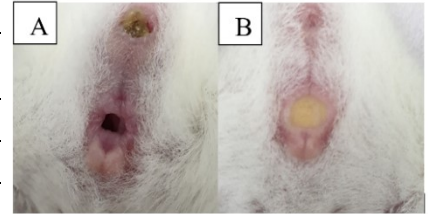
thể cực. Sau đó, các hợp tử quan sát thấy rõ ràng các tiền nhân sẽ được lựa chọn, các hợp tử bất thường như chỉ có một tiền nhân, có ba tiền nhân, màng bào tương không tròn đều,... bị loại bỏ. Như vậy, quá trình sàng lọc hợp tử giai đoạn hai tiền nhân của chúng tôi đã thành công. Các hợp tử này được chuẩn bị cho quá trình vi tiêm *egfp* và chuẩn bị cho quá trình chuyển phôi vào chuột mẹ mang thai hộ.

Chuyển phôi

Chuột cái mang thai hộ 0,5 đvc (days postcoitum) được sử dụng cho chuyển phôi vào ống dẫn trứng. Chuột cái mang thai hộ được cho là thành công khi có dấu hiệu giao phối với sự hiện diện của một lớp màu vàng nhạt ở nút nhầy âm đạo (hình 9 B) và sự hiện diện của đoạn bóng (ampulla) trên ống dẫn trứng chuẩn bị cho quá trình nhận phôi. Sau quá trình chuyển phôi 7-19 ngày, chuột nhận phôi có dấu hiệu mang thai và sinh con.

Bảng 3. Tỷ lệ thành công của việc tạo chuột cái mang thai giả

Số chuột sử dụng	Số chuột có sự hiện diện của ampulla (%)	Số chuột được sử dụng chuyển phôi
12	10 (83,33)	10
5	4 (80,00)	4
Trung bình	81,67%	

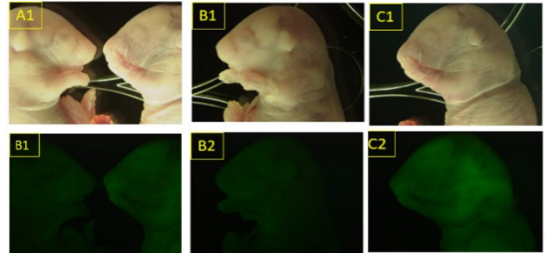


Hình 5. Âm hộ chuột cái
A. Trước giao phối. B. Sau giao phối

Trong tổng số 17 chuột (bảng 3) được kiểm tra dấu hiệu giao phối thành công (hình 9) để tạo chuột cái mang thai giả, có 14 trong số 17 (81,67%) chuột cái nhận phôi (pseudopregnant recipient females) được sử dụng để chuyển phôi. 3 trong số 17 (18,33%) chuột không được sử dụng để chuyển phôi mặc dù trước đó có sự hiện diện của sự giao phối thành công. Điều này cho thấy việc kiểm tra vị trí nhận phôi là ống dẫn trứng không có đoạn bóng và có đoạn bóng sau quá trình giao phối thành công với chuột đực bắt thụ là yếu tố quyết định việc chuyển phôi vào ống dẫn trứng chuột mẹ mang thai hộ. Từ kết quả trên, chúng tôi tiến hành chuyển phôi giai đoạn 1 - 2 tế bào vào đoạn ống dẫn trứng chuột mẹ và theo dõi quá trình mang thai.

Bảng 4. Tỷ lệ thành công của sự hình thành chuột mẹ mang thai hộ qua quá trình chuyển phôi

Số phôi được sử dụng	Số phôi được chuyển vào ống dẫn trứng	Số chuột mẹ mang thai /chuột mang thai hộ được sử dụng (%)	Số chuột con sinh ra biểu hiện huỳnh quang /chuột con được sinh ra
283	79 (ĐC)	4/4 (100)	0/69
(204+79)	204 (vi tiêm)	10/10 (100)	2/134



Hình 6. Chuột phát sáng huỳnh quang của protein egfp
A1, B1, C1: ảnh sáng trắng. A2, B2, C2: ảnh sáng kích thích có bước sóng 530 - 550 nm. Trong đó cặp đôi A1, A2 chuột bên trái là chuột không mang gen, chuột bên phải mang gen biểu hiện huỳnh quang egfp. B1, B2: Chuột không mang gen biểu hiện huỳnh quang egfp. C1, C2: Chuột mang gen biểu hiện huỳnh quang egfp

Nhằm chứng minh việc cấy chuyển phôi thành công vào chuột mẹ mang thai hộ, chúng tôi đã chuyển phôi mang gen phát sáng huỳnh quang và tiếp cận vị trí chuyển phôi thông qua ống dẫn trứng. Chuột con sinh ra phát sáng huỳnh quang được cho là quá trình chuyển phôi vào chuột mẹ mang thai hộ thành công (hình 10) Bảng 4 cho thấy trong 14 lần chuyển phôi đều cho 14 chuột mẹ mang thai hộ thành công với tỷ lệ 100%, trong đó ở lô đối chứng đối với phôi không vi tiêm, chúng tôi thu nhận được tỷ lệ chuyển phôi là 71,83% và ở thí nghiệm sử dụng phôi vi tiêm DNA chúng tôi thu nhận được tỷ lệ chuyển phôi là 65,69%. Mặc dù rất nhiều nghiên cứu đã chứng minh gen *egfp* không gây hại cho tế bào và được xem là một dấu hiệu nhận biết việc chuyển gen vào phôi hay tế bào. Tuy nhiên Hassanane và đồng tác giả (2017) chứng minh rằng việc chuyển gen ngoại lai vào tế bào làm giảm khả năng phân chia thành 2 tế bào (Hassanane *et al.*, 2017). Điều này lí giải vì sao kết quả chuyển phôi ở lô đối chứng không vi tiêm gen *egfp* vào hợp tử giai đoạn hai tiền nhân lại có kết quả chuyển phôi và mang thai cao hơn lô thí nghiệm. Theo thông báo của Ikawa và đồng tác giả (1995) trong nghiên cứu của họ đã sử dụng 12 chuột mang thai hộ, và ghi nhận được 9 chuột mang thai chiếm tỷ lệ 75%. González-Jara và đồng tác giả (2017) chuyển phôi giai đoạn 2 tế bào vào ống dẫn trứng trong tổng số 391 con chuột được chuyển phôi có 333 chuột mang thai đạt tỷ lệ thành công 85,2% và trong tổng số 5029 phôi được chuyển có 1824 phôi được chuyển thành công chiếm tỷ lệ thành công là 36,26% (González-Jara *et al.*, 2017). Như vậy các kết quả trên của chúng tôi đã chứng minh việc tạo chuột mẹ mang thai hộ và cấy chuyển phôi nhằm phục vụ các nghiên cứu tạo chuột chuyển gen và chuyển phôi từ vị trí ống dẫn trứng đóng vai trò quan trọng.

KẾT LUẬN

Nghiên cứu này đã cho thấy sự thành công của quá trình chuyển phôi vào ống dẫn trứng chuột cái mang thai hộ. Kết quả nghiên cứu này có tiềm năng to lớn trong việc ứng dụng tạo chuột chuyển gen trong tương lai phục vụ

cho các nghiên cứu y sinh học trong nước nhằm đưa các nghiên cứu của Việt Nam đến gần hơn với các nghiên cứu của thế giới.

Lời cảm ơn: Công trình này được thực hiện với nguồn kinh phí của TT CNSH TP. HCM (Mã số DV04/15-16 và DV02/17-19) và sự hỗ trợ của Khu nuôi động vật thử nghiệm - Trường Đại học Tsukuba - Nhật Bản. Nhóm tác giả xin gửi lời cảm ơn chân thành đến ban lãnh đạo Trung tâm CNSH và GS. Fumihiko Sugiyama, PGS. Mizuno, TS. Đinh Thị Hương Trà, chị Daitoku, chị Tanimoto ở Trường Đại học Tsukuba đã tiếp động lực và giúp đỡ trong suốt quá trình làm nghiên cứu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Byers SL, et al. (2012). Mouse Estrous Cycle Identification Tool and Images, *Plos one*: 7(4): 1-5.
- Carson DD, et al. (2000) Embryo implantation, *Developmental Biol* 223(2): 217-237.
- González-Jara P, et al. (2017) Optimization of the balance between effort and yield in unilateral surgical transfer of mouse embryos, *Laboratory Animals* 51(6): 622-628.
- Hassanane MS, et al. (2017) First study of sperm mediated gene transfer in Egyptian river buffalo, *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology. Acad Sci Res Technol*.
- Ikawa M, et al. (1995) A rapid and non-invasive selection of transgenic embryos before implantation using green fluorescent protein (GFP), *FEBS Lett* 375(1-2): 125-128.
- Ittner LM (2007) Pronuclear injection for the production of transgenic mice, *Nat Protoc* 2(5): 1207-1215
- Mizuno S, et al. (2014) Simple generation of albino C57BL/6J mice with G291T mutation in the tyrosinase gene by the CRISPR/Cas9 system, *Mammalian Genome* 25(7-8): 327-334.
- Modzelewski AJ, et al. (2018) Efficient mouse genome engineering by CRISPR-EZ technology, *Nature Protocols. Nature Publishing Group* 13(6): 1253-1274.
- Okabe M, et al. (1997) "Green mice" as a source of ubiquitous green cells, *FEBS Lett* 407(3): 313-319.
- Hishigami S, Wakayama S, Thuan NV, Ohta H, Mizutani E, Hikichi T, Bui HT, Balbach S, Ogura A (2006) Production of cloned mice by somatic cell nuclear transfer, *Nat Protoc* 1(1): 125-138.
- Vidal JD, Filgo AJ (2017) Evaluation of the Estrous Cycle, Reproductive Tract, and Mammary Gland in Female Mice, *Curr Protoc Mouse Biol* 7(4): 306-325.
- Wu Y, et al. (2019) Generating viable mice with heritable embryonically lethal mutations using the CRISPR-Cas9 system in two-cell embryos, *Nature Commun* 10(1).

INVESTIGATION OF MAKING EGFP TRANSGENIC MICE BY MICROINJECTION METHOD

Phan Ngoc Uyen Phuong^{1,2*}, Le Bao Tho³, Nguyen Thi Huynh Nhu⁴, Nguyen Thi Le Giang⁵, Dang Quan Nguyen¹, Duong Hoa Xo¹, Nguyen Trong Binh¹

¹ Biotechnology Center of Ho Chi Minh City

² Ho Chi Minh City University of Technology

³ Van Lang University, Ho Chi Minh City

⁴ Ton Duc Thang University, Ho Chi Minh City

⁵ University of Sciences, Vietnam National University, Ho Chi Minh City

SUMMARY

Transgenic mice have a wide potential in scientific research as well as applications, especially in the field of biomedicine. Although transgenic mice have been created and widely applied in the world, some transgenic mouse embryo studies have been researched and successful in Vietnam. However, to create genetically engineered mice, transgenic embryos must be transferred to surrogate mothers. Therefore, optimizing the embryo transfer contributes to the efficiency of genetically modified mice. Donor female mice were superovulated by 5 IU PMSG and after 24 hours of injection 5 IU hCG and mated with male mice. After 24 hours, the female mice were killed to collect the two pronuclear-stage embryos. The *Egfp* gene is transferred to the zygote by the microinjection method. Male mice were fertilized by a vasectomy. Pseudopregnant recipients were determined to be in estrus and paired with sterile males with plus checked will be implanted using open back surgery at ampulla in oviducts of pseudopregnant female mice. The results showed that male infertility was 80%. The correlation rate of the two methods of estrus determination is 100%. Female mice in the estrus period were mated with male sterile mice with a successful mating ratio of 81.67% for the pseudo pregnancy. 100% of mice receiving embryos showed signs of pregnancy. Our study shows the potential for great application in creating genetically modified mice for future scientific research.

Keywords: Pseudopregnant mice, estrus mice, male infertility, embryo transfer, transgenic mice.

* Author for correspondence: Tel: +84-933540491; Email: phuong.pnu@gmail.com