

## THU NHẬN VÀ NUÔI CẤY TẾ BÀO SINH DƯỠNG CỦA BÒ RỪNG *BOS JAVANICUS* (WAGRER, 1844) NHẪM BẢO TỒN NGUỒN GIEN CẤP ĐỘ TẾ BÀO

HOÀNG NGHĨA SƠN, TRẦN CẨM TÚ

*Viện Sinh học nhiệt đới*

LÊ VĂN TY

*Viện Công nghệ sinh học*

Bò rừng *Bos javanicus* (Wagrer, 1844) thuộc họ *Bovidae*, là loại thú cỡ lớn, có trọng lượng cơ thể 600 - 800 kg.

Bò rừng thích sống ở những vùng rừng thưa thoáng mát, nhất là rừng khộp hoặc những khu rừng rậm có thung lũng có nhiều cỏ.

Ở Việt Nam, trước đây bò rừng có nhiều ở các tỉnh Đồng Nai (Biên Hoà, La Ngà), Bà Rịa - Vũng Tàu, Bình Thuận (Phan Rí - Phan Thiết), Lâm Đồng, Đắk Lắk. Đây là loài thú quý hiếm của rừng nhiệt đới, thường bị săn bắn ở nhiều nơi nên đang đứng trước nguy cơ tuyệt chủng. Trong Sách Đỏ Việt Nam (2000), bò rừng được xếp ở cấp độ V (Sẽ nguy cấp) [1]; trong Danh lục Đỏ của IUCN (2004), bò rừng ở mức EN (Nguy cấp) [2]; còn trong Nghị Định 48/2002/NĐ-CP của Chính phủ, bò rừng được xếp trong phụ lục IB [3]. Do vậy, vấn đề bảo tồn nguồn gen là một trong những nhiệm vụ chiến lược của công nghệ sinh học Việt Nam.

Trên cơ sở tế bào sinh dưỡng của loài bò rừng có khả năng phát triển trong môi trường DMEM được bổ sung huyết thanh, đồng thời dựa vào những điều kiện sẵn có của phòng thí nghiệm, chúng tôi đã tiến hành thu nhận và nuôi cấy tế bào sinh dưỡng của bò rừng nhằm bảo tồn nguồn gen ở cấp độ tế bào và làm nguyên liệu để tạo dòng vô tính về sau này.

Kết quả thu được là tế bào sinh dưỡng của bò rừng phát triển tốt trong môi trường DMEM được bổ sung 10% huyết thanh của bào thai bê và đã thu được số lượng lớn tế bào fibroblast của bò rừng.

### I. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

#### 1. Hóa chất

Dung dịch PBS(-); cồn 70° (China); môi trường

DMEM (Gibco); FBS(Gibco); trypsin (Sigma); EDTA (Merk); polyvinyl alcohol (China); L-glutamine (Sigma); D-glucose (Sigma).

#### 2. Vật liệu

Mẫu mô của tai bò rừng được thu nhận tại cơ sở nuôi thú hoang dã ở khu vực Tuyên Lâm, thành phố Đà Lạt.

#### 3. Phương pháp

Nghiên cứu thực nghiệm được tiến hành tại Viện Sinh học nhiệt đới và Trường Đại học Quốc gia thành phố Hồ Chí Minh.

##### a. Phương pháp thu nhận và xử lý mẫu

Mẫu tai bò rừng sau khi được thu nhận, được rửa sạch trong môi trường PBS(-); một nửa cho vào tủy đông lạnh chứa 1 ml PBS 10% DMSO để đông lạnh. Nửa còn lại cho vào effendorf chuyển về phòng Thí nghiệm tế bào động vật, Viện Sinh học nhiệt đới.

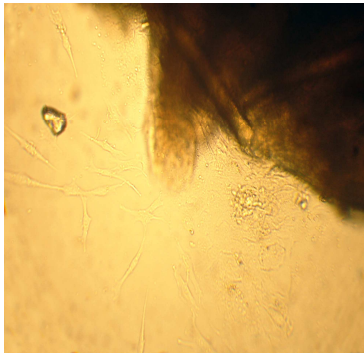
Mẫu tai bò rừng được xử lý qua những bước sau: effendorf chứa mẫu được xịt cồn 70° rồi đưa vào tủ vô trùng. Mẫu được rửa qua dung dịch PBS(-) 3 lần, rồi tiến hành cạo sạch lông. Sau đó, ngâm mẫu vào cồn trong vòng 10 giây và rửa lại 3 lần bằng dung dịch PBS(-).

##### b. Phương pháp nuôi sơ cấp mẫu mô

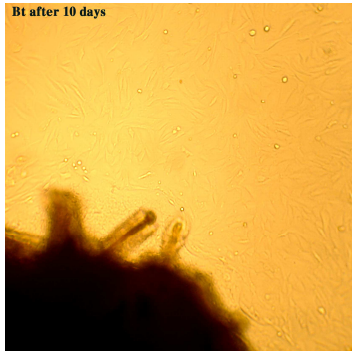
Tiến hành cắt nhỏ mẫu mô thành những mảnh có kích thước 0,5 × 0,5 mm. Sau đó, gấp những mảnh mô vào đĩa nhựa 4 giếng. Mỗi giếng từ 4 đến 5 mảnh mô. Chờ từ 20 đến 30 phút để mẫu mô cố định trên mặt đĩa.

Sau khi mẫu đã cố định, bổ sung 400 µl môi trường DMEM 10% FBS và chuyển vào tủ ấm 37 - 38°C; 5% CO<sub>2</sub> để nuôi cấy.

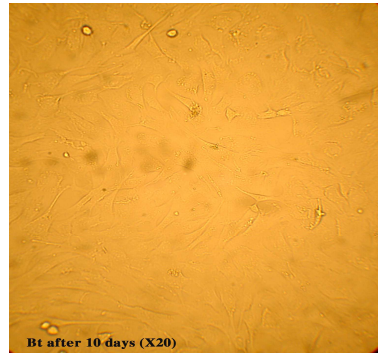
Sau mỗi 24 giờ, kiểm tra và ghi nhận hình ảnh.



**Hình 1.** Sau 4 ngày nuôi sơ cấp



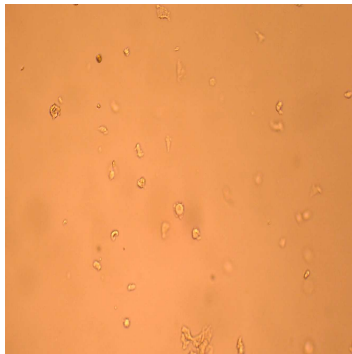
**Hình 2.** Sau 10 ngày nuôi



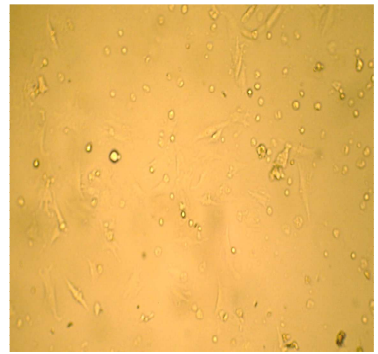
**Hình 3.** Tế bào sau 10 ngày nuôi (X20)



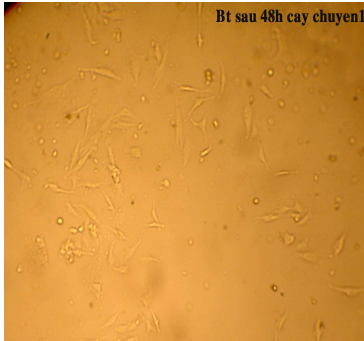
**Hình 4.** Tế bào sau 10 ngày nuôi (X10)



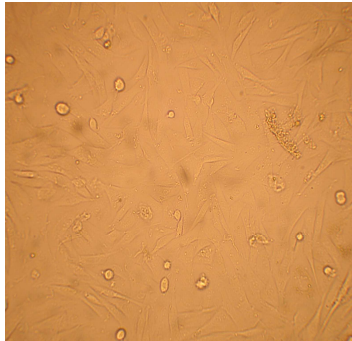
**Hình 5.** Sau khi tách bằng trypsin/edta 0,25%



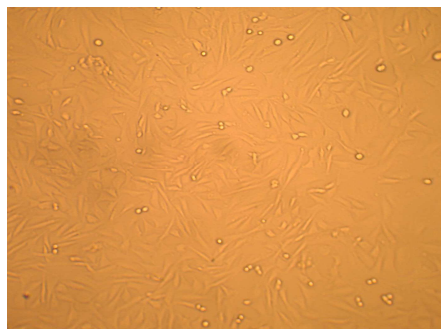
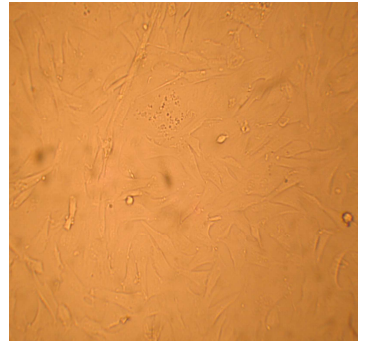
**Hình 6.** Tế bào sau 24 giờ được cấy chuyển lần 1



**Hình 7.** Tế bào sau 48 giờ cấy chuyển lần 1



**Hình 8.** Tế bào sau 48 giờ được cấy chuyển lần 2 (X20)



**Hình 9.** Tế bào sau 48 giờ được cấy chuyển lần 2 (X10)

### c. Phương pháp cấy chuyên

Mẫu mô được nuôi sau 5 ngày, gấp bỏ mảnh mô và bổ sung môi trường. Quan sát sự phát triển của nguyên bào sợi, khi thấy tế bào lan hết mặt đĩa thì tiến hành cấy chuyên.

Hút bỏ hết môi trường cũ ra, bổ sung vào 200  $\mu$ l trypsin/EDTA 0,25%; lắc nhẹ đĩa để tế bào tách khỏi mặt đĩa; quan sát dưới kính hiển vi, khi thấy tế bào bung ra hết thì bổ sung thêm 200  $\mu$ l môi trường DMEM 10% FBS để bắt hoạt trypsin.

Hút 200  $\mu$ l huyền phù tế bào vào đĩa 4 giếng mới và bổ sung thêm 200  $\mu$ l môi trường DMEM 10% FBS. Tiếp tục nuôi trong tủ ấm 5% CO<sub>2</sub>. Sau mỗi 24 giờ, kiểm tra và ghi nhận hình ảnh.

## II. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

### 1. Kết quả nuôi cấy sơ cấp mẫu mô da tai bò rừng

Khi được nuôi nguyên phát từ mảnh mô, các nguyên bào sợi tăng sinh rất nhanh, di cư ra khỏi mẫu mô ban đầu và phát triển rất tốt sau khi gấp bỏ mảnh mô ra khỏi môi trường nuôi cấy.

Có thể quan sát được rất nhiều tế bào phân chia trong đĩa nuôi với nhiều hình dạng khác nhau; sau 4 ngày, tế bào mọc lan ra và sau 10 ngày, tế bào lan hết bề mặt đĩa 4 giếng và có thể tiến hành cấy chuyên ra đĩa 4 giếng mới.

### 2. Kết quả sau khi cấy chuyên lần 1

Sau khi được cấy chuyên lần 1, các tế bào tiếp tục phân chia và phát triển mạnh trong môi trường nuôi cấy. Sau 6 ngày, tế bào mọc lan hết bề mặt của đĩa 4 giếng và đạt mật độ cấy chuyên qua đĩa mới.

Khi nuôi cấy *in vitro*, các tế bào bám trên bề mặt của đĩa đa phần có hình sao hoặc hình thoi, có nhân to hình cầu.

Tiếp tục cấy chuyên khi tế bào mọc lan ra hơn 80% diện tích của đĩa nuôi.

### 3. Kết quả sau khi cấy chuyên lần 2

Sau khi cấy chuyên lần 2, nguyên bào sợi vẫn tiếp tục phân chia và lan hết bề mặt của đĩa nuôi sau 6 ngày.

Hình dạng của tế bào có hình sao hoặc thoi, có nhân to hình cầu.

Điều này chứng tỏ, sau khi được nuôi cấy trong môi trường DMEM 10% FBS và cấy chuyên nhiều lần, tế bào thu được là nguyên bào sợi.

Mục tiêu đặt ra là nuôi cấy thành công nguyên bào sợi từ mẫu tai bò rừng. Trong quần thể tế bào thu được sau khi đã cấy chuyên 5 lần:

- Chủ yếu là nguyên bào sợi điển hình: có hình thoi, hình sao.

- Có sự sinh sản với phân bào điển hình.

Như vậy, quần thể nguyên bào sợi thu được chứng tỏ đã nuôi cấy thành công tế bào sinh dưỡng của bò rừng trong môi trường DMEM 10% FBS để thu nhận số lượng lớn tế bào nhằm bảo tồn nguồn gen ở cấp độ tế bào, tạo nguyên liệu cho những nghiên cứu sâu hơn như chuyển nhân, tạo dòng vô tính□.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bộ Khoa học, Công nghệ và Môi trường, 2000: Sách Đỏ Việt Nam, phần I: động vật. Nxb. Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.
2. IUCN, 2004: Red List of Threatened Species.
3. Chính phủ nước CHXHCN Việt Nam, 2002: Nghị Định 48/2002/NĐ-CP về sửa đổi, bổ sung danh mục thực vật, động vật hoang dã quý hiếm ban hành kèm theo NĐ 18/HĐBT ngày 17/1/2002 của Hội đồng Bộ trưởng.
4. Fresney I. R., 1984: Culture of animal cells: A manual of basic technique. Aln R. Liss, Inc., New York.
5. Nguyễn Phan Xuân Lý, 2006: Luận văn thạc sĩ “Thiết lập quy trình nuôi nguyên bào sợi từ da quy đầu người”. Trường Đại học Khoa học tự nhiên, ĐHQG thành phố Hồ Chí Minh.
6. Lê Văn Ty và cs., 2003: Tạp chí Công nghệ sinh học, 25(2): 1-6. Hà Nội.
7. Lê Văn Ty và cs., 2003: Nhân nuôi, bảo quản đông lạnh tế bào, tạo phôi bằng kỹ thuật cấy nhân nhằm bảo vệ đa dạng sinh học loài bò tót: 712-716. Hội nghị Công nghệ sinh học toàn quốc. Nxb. Khoa học và Kỹ thuật, Hà Nội.

# **COLLECT AND CULTURE OF BULL SOMATIC CELL *BOS JAVANICUS* (WAGRER, 1844) FOR GENE CONSERVATION**

**HOANG NGHIA SON, LE VAN TY**

## **SUMMARY**

Vietnam is a tropical country which has plentiful animals and plants, especially wide animals. Many animal species were listed in the Red Data Book of Vietnam (2000). However, many animal species were illegally hunted for aesthetic and economic purposes, for example bull.

According to some points of view, bull somatic cells had the ability to develop in the DMEM added serum; besides, in our lab conditions, we have collected and cultured bull somatic cells to gene conservation for the making of materials for cloning later.

Study results showed that bull somatic cells grew well in the DMEM medium added 10% FBS and we have collected a large number of typical fibroblasts.

*Ngày nhận bài: 1-9-2007*