

ẢNH HƯỞNG CỦA VIỆC BỔ SUNG HUYẾT THANH THAI BÒ TRONG MÔI TRƯỜNG NUÔI CẤY ĐẾN SỰ PHÂN LẬP VÀ TĂNG SINH TẾ BÀO NGUYÊN SỢI TỪ MẪU MÔ BUỒNG TRỨNG HEO

Lưu Khải Nhiên¹ và Nguyễn Ngọc Tấn^{1*}

Ngày nhận bài báo: 30/11/2022 - Ngày nhận bài phản biện: 11/12/2022

Ngày bài báo được chấp nhận đăng: 30/12/2022

TÓM TẮT

Nghiên cứu nhằm khảo sát sự ảnh hưởng của việc bổ sung huyết thanh thai bò (FBS-fetal bovine serum) ở các nồng độ khác nhau trong môi trường nuôi cấy tế bào đến sự hình thành và tăng sinh các tế bào nguyên sợi từ mô buồng trứng heo. Các mảnh mô buồng trứng được nuôi cấy sơ cấp trong môi trường DMEM có bổ sung FBS ở các nồng độ khác nhau, được nuôi trong 8 ngày và thay môi trường vào ngày thứ 4. Kết quả cho thấy số lượng tế bào thu được sau 8 ngày nuôi cấy ở môi trường có nồng độ 10% FBS thấp hơn so với 20% FBS (5,01 so với 5,57; $P < 0,05$). Ở 2 nghiệm thức bổ sung 10 và 20% FBS lần lượt cho 4 ngày đầu và 4 ngày sau và ngược lại, không có sự khác biệt ý nghĩa (5,46 và 5,40; $P > 0,05$) và không khác biệt so với nghiệm thức bổ sung 20% FBS trong suốt 8 ngày nuôi cấy. Nuôi tăng sinh của tế bào trong môi trường có nồng độ FBS là 10, 15 và 20%, kết quả cho thấy có sự khác biệt ý nghĩa ($P < 0,05$) về lượng tế bào thu được giữa 2 mức nồng độ 10 và 20% FBS ở ngày 3 (lần lượt là 4,04 và 4,24), ngày 5 (lần lượt là 4,24 và 4,45) và ngày 7 (lần lượt là 4,19 và 4,41). Tuy nhiên, không có sự khác biệt giữa việc bổ sung 15 và 20% vào môi trường nuôi thứ cấp. Thời gian phân chia của 3 mức bổ sung 10, 15 và 20% lần lượt là 68,89; 66,65 và 62,04 giờ. Đường cong tăng trưởng của tế bào nuôi cấy trong môi trường chứa nồng độ FBS khác nhau cho thấy lượng tế bào đạt cực đại vào ngày 5. Vì vậy, bổ sung FBS ở mức 10% trong 4 ngày đầu và 20% trong 4 ngày sau vào môi trường nuôi cấy sơ cấp và bổ sung 15% FBS vào môi trường nuôi cấy thứ cấp giúp cải thiện được lượng tế bào nguyên sợi phân lập và tăng sinh được từ mô buồng trứng heo.

Từ khóa: FBS, mô buồng trứng heo, nuôi cấy sơ cấp, nuôi cấy thứ cấp, tế bào nguyên sợi.

ABSTRACT

Effect of Fetal bovine serum supplementation in culture media on isolation and proliferation of fibroblast cells from porcine ovarian tissue

The aim of this study was to investigate to effect of fetal bovine serum (FBS) supplemented in culture medium for fibroblast cells from porcine ovarian tissue. Tissue explants were submitted to primary culture in medium with different concentration of FBS for 8 days with a medium change at day 4. Results shown that between the two treatments of supplementing 10 and 20% FBS throughout 8 days, a significant difference (5.01 and 5.57; $P < 0.05$) of cells harvested was found. No differences of harvested cell numbers were observed between supplementing 10-20 and 20-10% at first 4 days - later 4 days (5.46 and 5.40, respectively). Three levels of FBS concentration (10, 15 and 20%) were evaluated for subculture medium, proliferative activity of cells were recorded to build a growth curve and determine population doubling time (PDT). There were significant differences ($P < 0.05$) between 10 and 20% FBS supplementation in culture medium on day 3 (4.04 and 4.24, respectively), day 5 (4.24 and 4.45, respectively) and day 7 (4.19 and 4.41, respectively). No differences were recorded between the 15 and 20% treatments. The PDT of 10, 15 and 20% treatments was 68.89, 66.65 and 62.04 hours, respectively. The growth curve with the exponential phase spanning from day 1 to day 5 was determined. In conclusion, a supplementation of 10% FBS in the first 4 days and 20% FBS in the later 4 days of primary culture medium and subculture in medium with 15% FBS enhanced the total number of fibroblast cells isolated and proliferated from porcine ovarian tissue.

Keywords: FBS, fibroblast cells, porcine ovary tissue, primary culture, subculture.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Phân lập và tăng sinh tế bào nguyên sợi là bước đầu tạo nguồn vật liệu cho các thực nghiệm được lý trên tế bào, cấy chuyển nhân tế bào và/hoặc lưu trữ nguồn gen ở cấp độ tế bào. Trong nhiều quy trình nuôi cấy tế bào nguyên sợi được công bố trước đây, huyết thanh thai bò (fetal bovine serum - FBS) là một thành phần không thể thiếu trong môi trường nuôi cấy (Reiisi và ctv, 2009; Hu và ctv, 2013; Phelan và May, 2015; Bryja và ctv, 2020). Từ lâu, các nhà khoa học đã minh chứng rằng FBS sở hữu rất nhiều các yếu tố cần thiết cho sự phát triển và tăng sinh của tế bào có nguồn gốc từ động vật trong điều kiện nuôi cấy *in vitro* (Carrel và Ebeling, 1922; Treadwell và Ross, 1963). Tế bào nguyên sợi (fibroblast cells) là một loại tế bào có nhiều trong các mô liên kết với khả năng phát triển mạnh mẽ (Trần Thị Khánh Hòa và ctv, 2018), là một thành phần quan trọng trong hệ thống khung xương của các mô liên kết với khả năng sản sinh collagen. Với tính đơn lớp (monolayer) khi nuôi cấy *in vitro*, tế bào nguyên sợi được nuôi cấy với mục đích làm lớp tế bào nuôi (feeder layer) cho việc đồng nuôi cấy (coculture) với các loại tế bào, mô khác nhau để đánh giá sự ảnh hưởng trực tiếp giữa các loại tế bào (Allen và Wright, 1984; Yeoman và ctv,

¹ Trường Đại học Nông Lâm Tp. Hồ Chí Minh

* Tác giả liên hệ: TS. Nguyễn Ngọc Tấn, Giảng viên chính. Khoa Khoa học Sinh học - Trường ĐH Nông Lâm Tp. Hồ Chí Minh; Email: nntan@hcmuaf.edu.vn; ĐT: 0948 993 338.

2005). Tế bào CHO (tế bào được phân lập từ mô buồng trứng chuột đồng Trung Quốc - Chinese Hamster Ovary) là một điển hình cho ứng dụng tế bào phân lập từ mẫu mô buồng trứng cho nghiên cứu y sinh (Omara và ctv, 2010). Việc nghiên cứu ảnh hưởng của FBS khi được bổ sung ở nồng độ khác nhau trong nuôi cấy đến khả năng phân lập và tăng sinh tế bào nguyên sợi từ mẫu mô buồng trứng heo nhằm tạo cơ sở dữ liệu và nguồn tế bào cho các mục đích khác nhau là vấn đề cần thiết.

2. VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu, địa điểm và thời gian

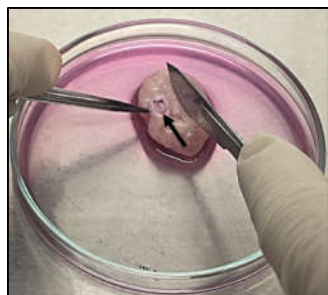
Buồng trứng heo được thu nhận tại lò mổ địa phương. Tất cả các hóa chất sử dụng trong nghiên cứu được nhập từ Sigma-Aldrich (Hoa Kỳ), những ngoại lệ sẽ được chỉ ra trong bài viết.

Nghiên cứu này được thực hiện tại Phòng Công nghệ Phôi Động vật, Viện Nghiên cứu Công nghệ Sinh học-Môi trường và Khoa Khoa học Sinh học-Trường ĐH Nông Lâm Tp. Hồ Chí Minh từ tháng 02/2022 đến tháng 11/2022.

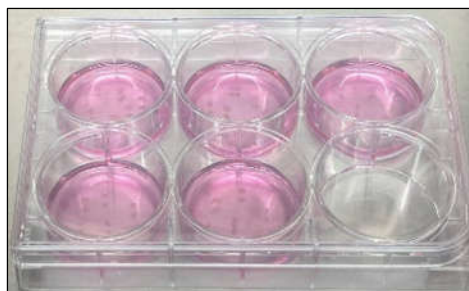
2.2. Phương pháp và nội dung nghiên cứu

2.2.1. Phương pháp thu nhận mảnh mô buồng trứng và nuôi cấy sơ cấp

Buồng trứng heo sau khi được vận chuyển về phòng thí nghiệm được lần lượt rửa với cồn 96% và D-PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline), sau đó chuyển sang đĩa petri chứa môi trường nuôi cấy DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) và 1% kháng sinh ABAM (Antibiotic-Antimycotic 100X). Sử dụng lưới dao phẫu thuật vô trùng để tách các nang noãn xung quanh và thu nhận phần mô bên trong của buồng trứng (Hình 1). Sau đó, cắt nhỏ thành các mảnh mô có kích thước khoảng 1mm^3 và chuyển vào trong đĩa nuôi cấy 6 giếng, 8 mảnh mô/giếng (Hình 2). Sau đó, chờ từ 4-5 phút cho các mảnh mô bám đĩa, thêm vào mỗi giếng 2ml DMEM bổ sung FBS theo thiết kế thí nghiệm và 1% ABAM, nuôi cấy ở môi trường 39°C , 5% CO_2 , thay môi trường nuôi cấy sau 4 ngày, tiếp tục nuôi cấy trong điều kiện như trên cho 4 ngày tiếp theo.



Hình 1. Vị trí thu nhận mô buồng trứng heo



Hình 2. Đĩa nuôi với các mảnh mô và môi trường

2.2.2. Phương pháp nuôi cấy thứ cấp

Sau nuôi cấy sơ cấp, tế bào được thu nhận và chuyển qua quá trình nuôi cấy thứ cấp. Môi trường cũ được loại bỏ, rửa bằng 1ml D-PBS, thêm vào mỗi giếng 500 μl Trypsin-EDTA 0,25% và đặt trong tủ ấm 39°C trong 5 phút. Thêm 500 μl DMEM bổ sung 10% FBS để bất hoạt trypsin. Huyền phù dịch tế bào và chuyển vào ống fancel 15ml, ly tâm ở 4.000 vòng/phút trong 5 phút. Loại bỏ dịch nổi, tái huyền phù cặn trong 1ml DMEM và đếm số lượng tế bào bằng buồng đếm hồng cầu. Pha loãng tế bào tới nồng độ 5×10^3 và chia đều vào 12 giếng (1,5 ml/giếng), nuôi cấy trong môi trường DMEM có bổ sung FBS ở các mức nồng độ theo thiết kế thí nghiệm.

2.2.3. Phương pháp đánh giá mật độ tế bào

Đếm tế bào thu được bằng buồng đếm hồng cầu Neubauer cải tiến 0,0025mm². Mật độ tế bào được tính bằng công thức $n = S \cdot 10^4$, trong đó S là trung bình số tế bào đếm được trong 4 ô góc của buồng đếm.

Đánh giá ảnh hưởng của việc bổ sung các nồng độ FBS khác nhau vào môi trường nuôi cấy sơ cấp đến sự phân lập tế bào nguyên sợi:

Mảnh mô sau khi thu nhận được đưa vào nuôi cấy sơ cấp ở môi trường DMEM bổ sung FBS ở nồng độ khác nhau: A: không bổ sung FBS (đối chứng); B: bổ sung 10% FBS ở 4 ngày đầu và 4

ngày sau; C: bổ sung 10% FBS ở 4 ngày đầu, 20% FBS ở 4 ngày sau; D: bổ sung 20% FBS ở 4 ngày đầu, 10% FBS ở 4 ngày sau và E: bổ sung 20% FBS ở 4 ngày đầu và 4 ngày sau. Đếm tế bào thu nhận được ngày ngày thứ 8 bằng buồng đếm hồng cầu, thí nghiệm được lặp lại 04 lần.

Đánh giá ảnh hưởng của việc bổ sung các nồng độ FBS khác nhau trong nuôi cấy thứ cấp đến khả năng tăng sinh của tế bào nguyên sợi:

Nuôi cấy sơ cấp sử dụng mức nồng độ FBS tối ưu được xác định ở nội dung 1, thu nhận tế bào nguyên sợi sau 8 ngày và đưa vào nuôi cấy thứ cấp. Tế bào được nuôi trong đĩa 12 giếng, trong đó có 4 giếng được bổ sung 10% FBS, 4 giếng được bổ sung 15% FBS và 4 giếng được bổ sung 20% FBS, tương đương với 3 nghiệm thức. Thu nhận và đếm tế bào ở các thời điểm 1, 3, 5, và 7 sau nuôi cấy thứ cấp theo từng nồng độ FBS, thí nghiệm được lặp lại 04 lần. Thời gian phân chia (Population Doubling Time) được tính bằng công thức $PDT=t.\log_2/(\log(N_2/N_1))$ với t là thời gian tế bào trong pha log, N1 và N2 lần lượt là số tế bào đếm được ở đầu và cuối của pha log.

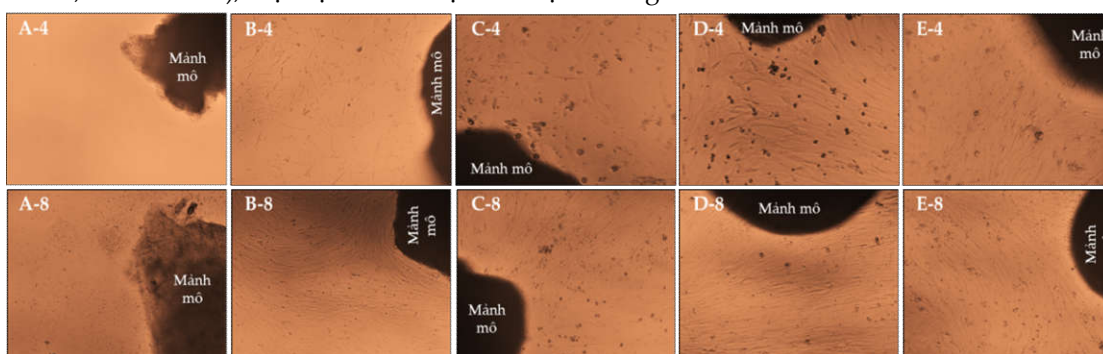
2.3. Xử lý số liệu

Số liệu được xử lý theo phương pháp thống kê mô tả và phân tích phương sai một yếu tố (ANOVA). Các số liệu được trình bày dưới dạng trung bình \pm sai số chuẩn (SEM). Các giá trị được chuyển về dạng logarit trước khi phân tích ANOVA, sử dụng trắc nghiệm Tukey để so sánh và sai khác có ý nghĩa khi $P<0,05$.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Ảnh hưởng của bổ sung các nồng độ FBS khác nhau đến sự phân lập tế bào nguyên sợi

Sau 8 ngày nuôi cấy sơ cấp, số lượng tế bào được đếm bằng buồng đếm hồng cầu dưới kính hiển vi, hình ảnh đại diện hình thái tế bào nguyên sợi ở ngày 4 (Hình 3, A-4 đến E-4) và ngày 8 (Hình 3, A-8 đến E-8), mật độ tế bào được thể hiện ở bảng 1.



Hình 3. Hình thái tế bào nguyên sợi nuôi cấy từ mảnh mô buồng trứng ở ngày 4 (A-4 đến E-4) và ngày 8 (A-8 đến E-8) của nuôi cấy sơ cấp

A: 0%-0% FBS, B: 10%-10% FBS, C: 10%-20% FBS, D: 20%-10% FBS, E: 20%-20% FBS (độ phóng đại 100 lần).

Kết quả ở hình 3 cho thấy, sau 4 ngày nuôi cấy sơ cấp ở các mức nồng độ khác nhau, chưa quan sát được sự hình thành tế bào nguyên sợi mặc dù có sự bám dính của mảnh mô ở nồng độ 0% FBS (Hình 3A-4). Ghi nhận được sự hình thành tế bào nguyên sợi từ các mảnh mô bám dính ở các nghiệm thức còn lại với mật độ dày đặc hơn ở nồng độ 20% FBS trong 4 ngày đầu (Hình 3D-4, E-4) so với 10% FBS (Hình 3B-4, C-4). Hình thái của các tế bào nguyên sợi được nuôi cấy ở mức 20% FBS cũng thể hiện sự kéo dài về hai cực hơn so với ở mức 10% FBS.

Sau 8 ngày nuôi cấy sơ cấp, quan sát được sự hình thành của tế bào nguyên sợi rải rác và nhỏ ở rìa mảnh mô ở nồng độ 0% FBS (Hình 3A-8). Đối với các mức bổ sung khác thấy được độ bao phủ khoảng 70% và hình thái tế bào nguyên sợi rõ ràng hơn so với ngày 4 của nuôi cấy sơ cấp (Hình 3B-8 đến 3E-8).

Tiến hành đếm tế bào thu được ở ngày thứ 8 sau nuôi sơ cấp, kết quả trình bày ở bảng 1 cho thấy sự khác biệt rõ rệt về khả năng hình thành và phát triển của tế bào nguyên sợi khi nuôi cấy có bổ sung FBS ở các mức nồng độ khác nhau. Nuôi cấy có bổ sung 20% FBS suốt 8 ngày của nuôi cấy sơ cấp (E) cho kết quả về số lượng tế bào phân lập (5,57; $P<0,05$) cao có ý nghĩa so với nghiệm thức không bổ sung (A; 4,52) và chỉ bổ sung 10% FBS trong 8 ngày nuôi cấy (B; 5,01). Tuy nhiên, khi bổ sung 20% FBS trong 8 ngày (E; 5,57) không có sự khác biệt ý nghĩa ($P>0,05$) so với

nghiệm thức bổ sung 10% FBS trong 4 ngày đầu và 20% FBS trong 4 ngày sau (C; 5,46) hay bổ sung 20% FBS trong 4 ngày đầu và 10% FBS ở 4 ngày sau (D; 5,40).

Bảng 1. Ảnh hưởng của các nồng độ FBS khác nhau đến mật độ tế bào sau 8 ngày nuôi cấy sơ cấp

| Nghiệm thức | Nồng độ FBS (%) | | Mật độ tế bào trung bình sau 8 ngày | |
|-------------|-----------------|------------|-------------------------------------|-------------------------------|
| | 4 ngày đầu | 4 ngày sau | Mật độ tế bào ($\times 10^4$) | Log (TB \pm SEM) |
| A | 0 | 0 | 3,45 | 4,52 ^c \pm 0,08 |
| B | 10 | 10 | 10,86 | 5,01 ^{bc} \pm 0,10 |
| C | 10 | 20 | 34,59 | 5,46 ^{ab} \pm 0,16 |
| D | 20 | 10 | 30,22 | 5,40 ^{ab} \pm 0,16 |
| E | 20 | 20 | 39,58 | 5,57 ^a \pm 0,09 |

Trong cùng cột, số liệu có các chữ cái khác nhau sai khác có ý nghĩa thống kê ($P < 0,05$). Số liệu được trình bày dưới dạng Trung bình \pm sai số chuẩn từ 04 lần lặp lại.

Khi bổ sung 10 hoặc 20% FBS, đều đạt được lượng mảnh mô bám đĩa và độ bao phủ tối đa của tế bào nguyên sợi trong nuôi cấy sơ cấp (Santos và ctv, 2016). Bổ sung 5% FBS thấp hơn có ý nghĩa so với 10 và 15% về lượng tế bào thu được sau 24 giờ nuôi cấy sơ cấp tế bào cumulus heo (Hà Thị Tuyết Tâm, 2019).

3.2. Ảnh hưởng của việc bổ sung các nồng độ FBS khác nhau trong nuôi cấy thứ cấp đến khả năng tăng sinh của tế bào nguyên sợi

Tế bào nguyên sợi sau nuôi cấy sơ cấp ở nghiệm thức C của nội dung 1 được sử dụng cho nuôi cấy thứ cấp. Cây chuyển sang đĩa nuôi 12 giếng với mật độ khoảng 5×10^3 /giếng trong môi trường DMEM có bổ sung FBS lần lượt là 10, 15 và 20%. Số lượng tế bào ở các thời điểm sau nuôi cấy được đếm và tổng hợp ở bảng 2.

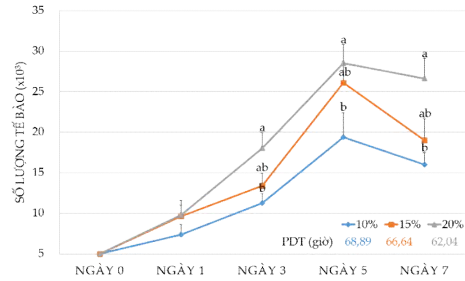
Bảng 2. Ảnh hưởng của FBS đến sự tăng sinh của tế bào nguyên sợi trong nuôi cấy thứ cấp

| Nồng độ FBS (%) | Log của mật độ tế bào ở các thời điểm sau nuôi cấy thứ cấp | | | | | Thời gian phân chia (giờ) |
|-----------------|--|------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|---------------------------|
| | Ngày 0 | Ngày 1 | Ngày 3 | Ngày 5 | Ngày 7 | |
| 10 | 3,70 | 3,82 ^a \pm 0,08 | 4,04 ^b \pm 0,04 | 4,24 ^b \pm 0,08 | 4,19 ^b \pm 0,04 | 68,89 |
| 15 | 3,70 | 3,92 ^a \pm 0,09 | 4,11 ^{ab} \pm 0,05 | 4,40 ^{ab} \pm 0,04 | 4,25 ^{ab} \pm 0,06 | 66,64 |
| 20 | 3,70 | 3,96 ^a \pm 0,06 | 4,24 ^a \pm 0,05 | 4,45 ^a \pm 0,03 | 4,41 ^a \pm 0,04 | 62,04 |

Kết quả ở bảng 2 cho thấy, sau khi được cấy tăng sinh, số lượng tế bào tăng dần theo thời gian, đạt cực đại ở ngày 5 và bắt đầu suy giảm ở ngày 7 ở cả 3 nghiệm thức. Tại ngày 1, số lượng tế bào trung bình ở ba mức nồng độ FBS không có khác biệt ý nghĩa. Ở các thời điểm sau nuôi cấy (ngày 3, 5 và 7) trung bình số lượng tế bào thu nhận được khi bổ sung 20% FBS cho kết quả cao hơn một cách có ý nghĩa so với bổ sung 10% FBS, nhưng không có khác biệt có ý nghĩa so với mức bổ sung nồng độ 15% FBS. Dữ liệu tại bảng 2 được sử dụng để tính thời gian phân chia (PDT) của 3 nghiệm thức, kết quả cho thấy PDT giảm dần khi bổ sung tăng dần nồng độ FBS trong môi trường nuôi cấy với mốc thời gian phân chia là 68,89; 66,64 và 62,04 giờ khi bổ sung lần lượt 10, 15 và 20% FBS trong môi trường nuôi tăng sinh.

Dựa vào dữ liệu ở bảng 2, đường cong tăng trưởng của tế bào trong nuôi cấy thứ cấp ở ba mức nồng độ FBS khác nhau được xây dựng và trình bày ở hình 4. Kết quả ở hình 4 cho thấy, pha log khoảng 24 giờ sau cấy chuyển, pha log (ngày 1 - ngày 5), pha cân bằng (ngày 5) và pha suy vong (ngày 7) của nuôi cấy thứ cấp.

Tương tự với kết quả của Santos và ctv (2016), thời gian phân chia của tế bào nguyên sợi khi nuôi cấy bổ sung 20% FBS được rút ngắn đáng kể so với 10% FBS. Bên cạnh đó, bổ sung 15% FBS cũng cho PDT ngắn hơn so với khi bổ sung 5 và 10% FBS (Hà Thị Tuyết Tâm, 2019). Huyết thanh thai bò tác động tích cực đến hình thái của tế bào nguyên sợi với sự gia tăng tỷ lệ tăng sinh, thời gian phân chia, số thế hệ cấy chuyển cũng như là khả năng kích hoạt sự biệt hóa tế bào (Franke và ctv, 2014).



Hình 4. Đường cong sinh trưởng và thời gian phân chia của tế bào nguyên sợi trong nuôi cấy thứ cấp

4. KẾT LUẬN

Nuôi cấy sơ cấp trong môi trường có bổ sung 10% FBS trong 4 ngày đầu, 20% FBS trong 4 ngày sau và nuôi cấy thứ cấp trong môi trường bổ sung với 15% FBS giúp tăng hiệu quả nuôi cấy phân lập và tăng sinh tế bào nguyên sợi từ mẫu mô buồng trứng heo.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Allen R.L. and Wright R.W. (1984). In vitro development of porcine embryos in coculture with endometrial cell monolayers or culture supernatants. J. Anim. Sci., 59(6): 1657-61.
- Bryja A., Latośiński G., Jankowski M., Angelova Volponi A., Mozdziak P., Shibli J.A. and Dyszkiewicz-Konwińska M. (2020). Transcriptomic and morphological analysis of cells derived from porcine buccal mucosa - studies on an *in vitro* model. Animals, 11(1): 15.
- Carrel A. and Ebeling A.H. (1922). Heat and growth-inhibiting action of serum. J. of Experimental Medicine, 35(5): 647-56.
- Franke J., Abs V., Zizzadoro C. and Abraham G. (2014). Comparative study of the effects of fetal bovine serum versus horse serum on growth and differentiation of primary equine bronchial fibroblasts. BMC Vet. Res., 10(1): 119.
- Trần Thị Khánh Hòa, Hoàng Thùy Dương và Nguyễn Thị Kim Anh (2018). Nuôi cấy tế bào sợi từ mô chuột. Tạp Chí Sinh Học, 40(1): 69-75.
- Hu P.F., Guan W.J., Li X.C., Zhang W.X., Li C.L. and Ma Y.H. (2013). Study on characteristics of in vitro culture and intracellular transduction of exogenous proteins in fibroblast cell line of Liaoning Cashmere goat. Mol. Biol. Reports, 40(1): 327-36.
- Omasa T., Onitsuka M. and Kim W.D. (2010). Cell engineering and cultivation of chinese hamster ovary (CHO) cells. Current Pharmaceutical Biotechnol., 11: 233-40.
- Phelan K. and May K.M. (2015). Basic techniques in mammalian cell tissue culture. Current Protocols in Cell Biol., 66(1): 1-22.
- Reiisi S., Esmaeili F. and Shirazi A. (2009). Isolation, culture and identification of epidermal stem cells from newborn mouse skin. In vitro Cellular & Developmental Biology - Animal, 46(1): 54-59.
- Santos M.L.T., Borges A.A., Neta L.B.Q., Santos M.V.O., Oliveira M.F., Silva A.R. and Pereira A.F. (2016). In vitro culture of somatic cells derived from ear tissue of collared peccary (*Pecari tajacu Linnaeus, 1758*) in medium with different requirements. Pesquisa Vet. Brasileira, 36(12): 1194-02.
- Hà Thị Tuyết Tâm (2019). Khảo sát nồng độ FBS cho nuôi phân lập và tăng sinh tế bào nguyên sợi từ tế bào cumulus ở heo. Khóa Luận Tốt Nghiệp, Trường Đại học Nông Lâm TP.HCM.
- Treadwell P. and Ross J. (1963). Characterization of human cells: Variation in growth rate, volume, morphology and growth efficiency in media supplemented with human serum or bovine fetal serum. Exp. Cell Res., 29(1-2): 356-79.
- Yeoman R., Wolf D. and Lee D. (2005). Coculture of monkey ovarian tissue increases survival after vitrification and slow-rate freezing. Fertility and Sterility, 83(4): 1248-54.