

Biên soạn:

ĐẶNG HỮU LANH
NGUYỄN MINH CỘNG
LÊ ĐÌNH TRUNG

Biên tập:

BÙI ĐÌNH HỘI

PHẦN THỨ NHẤT

CƠ SỞ VẬT CHẤT CỦA TÍNH DI TRUYỀN

CHƯƠNG I

CƠ SỞ TẾ BÀO HỌC CỦA TÍNH DI TRUYỀN

I - NHỮNG NGUYÊN TẮC CHUNG TRONG VIỆC CHUẨN BỊ TIÊU BẢN HIỆN VI

I - Chọn đối tượng và chuẩn bị mẫu cố định.

1.1. Chọn đối tượng.

Việc quan trọng đầu tiên là lựa chọn các cơ quan, các mô cần thiết để nghiên cứu tế bào. Ví dụ muốn nghiên cứu phân bào gián phân (mitose) có thể sử dụng các mô phân sinh đầu rễ non, các rễ chính của hạt nảy mầm, đỉnh sinh trưởng của cây, các lá non là tốt nhất. Thường người ta hay sử dụng các mô ở chóp rễ non để nghiên cứu phân bào gián phân vì ở đây tập trung các vùng tế bào phân chia rất mạnh, hình dáng tế bào lại được định hướng thích hợp. Để nghiên cứu hình thái và đếm số lượng nhiễm sắc thể trong phân bào giảm nhiễm (meiose) thường dùng các tế bào mẹ của tiêu bản tử được cố định sau vài ngày lúc mới nhú bông. Ở đậu và các loại cây khác thì dùng các nụ hoa không lớn lúc chưa có màu đặc trưng. Nhiều trường hợp người ta sử dụng các bao phấn non. Ở lúa nước, người ta cố định các bông mới nhú ra khỏi đòng khoảng một phần năm bông, lúc nghiên cứu thì sử dụng các hoa ở giữa bông vì các hoa này có độ thành thực tốt, số tế bào mẹ hạt phấn đang bước rộ vào giai đoạn giảm phân. Ở động vật, người ta thường sử dụng các tế bào bạch cầu, các tế bào tủy xương. Một điều đáng lưu ý trong các buổi thực hành gắn trên lớp muốn đạt kết quả tốt cần chọn đối tượng đạt mấy tiêu chuẩn sau:

— Để phá vỡ màng tế bào, màng nhân, dễ dễ tung nhiễm sắc thể ra ngoài lúc làm tiêu bản ép.

- Nhiễm sắc thể có kích thước lớn, các nhiễm sắc thể dễ phân biệt với nhau. Trong bộ nhiễm sắc thể càng có nhiều dạng nhiễm sắc thể khác nhau thì càng tốt.

- Để trồng, phổ biến trong thời vụ để tiện việc thu lượm mẫu lúc cần thiết.

1.2. Chuẩn bị mẫu cố định

Sau khi chọn được mẫu cần thiết để nghiên cứu phải chú ý đảm bảo đúng qui trình chuẩn bị để cố định. Bởi vì tính chính xác của thí nghiệm phụ thuộc rất nhiều vào điều này. Ví dụ để làm các tiêu bản quan sát sự phân chia tế bào ở chóp rễ non phải tạo điều kiện cực thuận về nhiệt độ, chế độ nước, chế độ ánh sáng cho rễ cây phát triển bình thường. Mặt khác tùy thuộc vào mục đích quan sát của thí nghiệm mà khống chế nhiệt độ, thời gian sinh trưởng, phát triển của đối tượng nghiên cứu khi đưa cố định. Ví dụ đối với chóp rễ non, muốn quan sát thời gian bắt đầu những phân chia gián phân đầu tiên, người ta nhận thấy rằng ở cùng một nhiệt độ 23 — 25°C các phân chia nguyên nhiễm đầu tiên ở hạt nảy mầm của các loài cây khác nhau không như nhau: ở *crepis capillaris* (L) phân chia gián phân đầu tiên xảy ra lúc rễ có độ dài 2 — 3mm, ở *vicia faba* (L) là 12 — 17mm, ở *Nigelladamascena* (L) là 2 — 4mm, ở *Triticum aestivum* là 8 — 10mm, ở hành tây (*Allium cepa*) 6 — 12mm.

Đa số các thí nghiệm thu được đều cho thấy số tế bào phân chia vào các giờ khác nhau trong ngày cũng không giống nhau. Vì vậy để thu được kết quả cần phải lưu ý đến chu kì phân chia gián phân để cố định mẫu vật vào từng thời điểm khác nhau tùy theo đối tượng và mục đích nghiên cứu.

Để nghiên cứu phân bào gián phân và đếm số lượng nhiễm sắc thể cần trồng các đối tượng đạt tiêu chuẩn trên trong điều kiện đồng ruộng, ngoài vườn trường, trong chậu hoặc trên các đĩa petri, khay men có đế giấy thấm. Khống chế nhiệt độ ổn định trong khoảng 23 — 25°C trong tủ ấm hoặc dưới ánh đèn điện. Sau vài ngày rễ mọc dài rồi cố định rễ vào những thời điểm có độ dài rễ khác nhau tùy theo từng đối tượng. Ví dụ ở đậu *vicia faba* thì phân bào gián phân tối đa ở các rễ non dài 1 — 1,5 cm; ở đậu Hà lan là 1,5 — 2cm; còn ở rễ hành tây 1,2 — 1,5cm và ở lúa nước là: 0,8 — 1cm (nghiên cứu của bộ môn di truyền đại học sư phạm I Hà nội).

Trường hợp hạt quá nhỏ như hành tây, cà chua, thuốc lá... có thể cố định cả hạt nảy mầm. Cần lưu ý trước khi cố định các hạt đã nảy mầm cần rửa qua nước lạnh để khử độ chua. Trong thời gian cố định và giữ mẫu vật nếu thấy nước cố định hay nước giữ mẫu vật vẫn đục phải thay dung dịch ngay.

Đối với cây trồng trong chậu, cần phải đảm bảo độ chiếu sáng, độ ẩm, độ tơi xốp của đất, tránh làm ảnh hưởng đến tốc độ phát triển của hệ rễ. Sau một thời gian nhất định (từ một đến hai tuần), rễ đã mọc đúng kích thước, bắt đầu cố định trong điều kiện bóng râm để rễ không bị héo.

Trong phòng thí nghiệm, muốn cố định rễ của các thực vật sinh sản bằng căn hành, thân củ, hom, người ta đặt chúng trong cát ẩm ở nhiệt độ 25°C hoặc trồng chúng trong dung dịch dinh dưỡng nhân tạo như dung dịch Knopp hay các dung dịch khác.

2 Xử lí các đối tượng trước lúc cố định.

Đối với những trường hợp khó đếm nhiễm sắc thể hoặc nhiễm sắc thể quá dài, trước lúc cố định phải xử lí bằng những thuốc đặc hiệu như: 8 - oxiquinolin, cloran hydrat, consixin, paradi clorobenzen...

8 - oxiquinolin có thể dùng để xử lí sơ bộ mẫu nghiên cứu hoặc có thể dùng như một thành phần của thuốc cố định. Ở trường hợp đầu, dung dịch 8 - oxiquinolin pha với nồng độ 0,002M trong điều kiện nhiệt độ 60°C. Lúc sử dụng, hạ thấp nhiệt độ xuống 10 - 14°C. Mẫu vật để trong dung dịch đó khoảng 3h, rồi rửa sạch mẫu bằng nước cất và chuyển mẫu vào dung dịch cố định. Phương pháp này sử dụng để chuẩn bị tiêu bản tạm thời và cố định. Người ta dùng 0,58 gam 8 - oxiquinolin hòa tan trong 200 ml nước cất ấm. Xử lí sơ bộ dung dịch này làm tăng độ lớn của nhiễm sắc thể lên 1,5 lần mà không làm thay đổi chiều dài nhiễm sắc thể, thậm chí các eo sơ cấp, eo thứ cấp lại còn hiện hình rõ hơn. Nếu làm lạnh mẫu vật ở 0°C trong thời gian 24h, rồi xử lí 8 - oxiquinolin thì nhiễm sắc thể sẽ co ngắn lại, rất thuận tiện cho việc đếm các nhiễm sắc thể dài. Kagava đã sử dụng dung dịch cloran hydrat ở nồng độ 0,3 - 1%, ngâm các rễ non vào dung dịch đó trong khoảng 1h. Sau đó rửa qua nước máy một giờ rồi bỏ vào buồng ấm 2 - 4h, rồi mới cố định. Phương pháp này cũng làm cho nhiễm sắc thể co ngắn lại.

Mấy năm gần đây trước khi cố định mẫu người ta dùng consixin ở nồng độ thấp 0,01 - 0,05% để xử lí mẫu vật làm ngừng quá trình phân chia, gián phân, tăng khả năng bắt gặp các tế bào đang bước vào giai đoạn kì giữa (metaphase). Ví dụ, trước khi cố định, các rễ, các lá non *crepis capillaris* (L) được ngâm trong dung dịch consixin có nồng độ nhất định khoảng 2h. Trên đối tượng động vật thường xử lí consixin có nồng độ 0,05% để phá hủy thoi tơ vô sắc, tích lũy các tế bào đang phân chia ở giai đoạn kì giữa. Ngoài ra có thể sử dụng paradi clorobenzen đậm đặc để xử lí rễ. Cách làm như sau: lấy 5 - 10 gam paradi clorobenzen tinh thể hòa tan trong 500ml nước cất, để trong bình đậy kín đặt vào tủ ấm ở nhiệt độ 60°C khoảng 10 - 12h. Hạ thấp nhiệt độ dung dịch trên xuống 12 - 16°C rồi xử lí các mẫu vật nghiên cứu trong khoảng 2 - 3h.

Cũng có thể sử dụng consixin kết hợp với việc xử lí bằng hỗn hợp dung dịch paradi clorobenzen đậm đặc và 8 - oxiquinolin 0,002 M (tỉ lệ 1 : 1) để phân tích kiểu nhân (karyotype). Hiện nay ở một số phòng thí nghiệm của các nước người ta còn nhận thấy nếu làm lạnh đột ngột các tế bào nghiên cứu trước khi cố định trong 24 h, ở nhiệt độ 1 - 2°C cũng đưa đến hậu quả làm ngắn rõ rệt nhiễm sắc thể. Một số trường hợp, để nghiên cứu hình thái nhiễm sắc thể, trước lúc cố định người ta xử lí mẫu vật theo một trong hai phương pháp sau :

- Đưa mẫu vật vào dung dịch cumarin 2% trong 2 h liền ở nhiệt độ 12 - 16°C.

- Dùng hỗn hợp cumarin và 8 - oxiquinolin (theo tỉ lệ 1 : 1) trong 2 h ở nhiệt độ 16°C.

3. Các loại thuốc cố định và hiệu quả của chúng.

Cố định là phương pháp giết chết vật sống bằng các chất độc mà vẫn giữ nguyên cấu trúc của nó. Vì vậy cần phải giết chết vật sống một cách nhanh chóng để tránh các biến đổi khi định hình, giữ được cấu trúc bền vững, không sinh ra cấu trúc giả. Trên thực tế không có chất cố định nào là không làm biến đổi vật sống. Vì thế người ta thường dùng chất cố định kép để mỗi một chất cố định giữ được một mặt của cấu tạo. Chất cố định có tác dụng đẩy không khí ra, làm vững chắc mô, đông đặc nhanh các thành phần của mẫu vật, tạo điều kiện thuận lợi cho nhuộm màu. Muốn cố định đạt hiệu quả cao mẫu vật phải tươi, chất cố định phải ngấm nhanh chóng, đều đặn, phải cố định được từng bộ phận riêng biệt của tế bào.

Tùy thuộc vào đối tượng và mục đích thí nghiệm mà sử dụng các loại thuốc cố định khác nhau. Đối với các thí nghiệm tế bào học và phối thai hợp thường sử dụng thuốc cố định nhân của Navaxin, của Carnoy. Muốn cố định tốt các thể hạt sợi và thể hạt thì dùng thuốc cố định của G.A. Levitski. Trong thành phần thuốc cố định nhân có axit axetic, formalin, clorofoc, axit fomic còn... Vì tác dụng một mặt của nó nên thông thường dùng thuốc cố định kép ít khi dùng thuốc cố định đơn.

3.1. Tác dụng của một số chất cố định.

a) *Axit axetic*: Có tác dụng xâm nhập nhanh chóng vào các mô, gây nên sự kết tủa axit nucleic. Theo G.I. Roskin và L.B. Levinson thì axit axetic giữ tốt hình dạng nhiễm sắc thể nhưng lại phá hủy thể hạt sợi và tiêu thể gônji. Có thể dùng axit axetic là một thành phần, hay có thể dùng độc lập như một chất cố định. Nhiều tài liệu mới đây đều nhận thấy axit propionic lại là chất có khả năng cố định và nhuộm màu tốt hơn axit axetic.

b) *Axit cromic*: Axit này ngấm vào mẫu vật không mạnh nhưng có thể làm đông đặc protein, giữ lại các chi tiết cấu tạo của nhân, của tế bào chất cũng như thể hạt sợi, tiêu thể gônji.

c) *Axit fomic*: Ngấm vào đối tượng chậm, đôi khi không đều, nhưng ít gây biến đổi trong kết cấu của tế bào chất và nhân, dùng axit này có thể cố định các thể hạt sợi.

d) *Formalin*: Như một thành phần của các chất cố định nhân, nó giữ được cấu trúc tinh vi của tế bào chất, thể hạt sợi v.v... Nhưng có nhược điểm ăn màu cacmin kém khi cố định bằng chất trên.

Các thuốc cố định đều được pha trong cồn hoặc trong nước. Các thuốc cố định pha trong cồn ngấm nhanh vào các mô và giữ được mẫu vật trong đó từ 30 phút đến 12 h. Các thuốc cố định pha trong nước thì ngấm vào các mô chậm hơn. Tùy thuộc vào mục đích và đối tượng nghiên cứu mà chọn thuốc cố định cho thích hợp. Đối với những nụ hoa nhỏ rễ non rất bé thì dùng thuốc cố định pha trong nước. Đối với những nụ hoa to, rễ lớn, màng xenulopza dày thì dùng thuốc cố định pha trong cồn. Đối với những đối tượng khó ngấm thuốc (bao phấn, búp non...) để đạt hiệu quả cao đầu tiên xử lí bằng thuốc cố định pha cồn, vài phút sau đó cố định trong thuốc pha nước.

3.2. Thành phần của một số chất cố định chủ yếu :

a) *Thuốc cố định Navaxin* (1 : 4 : 1) : Được dùng để cố định các rệp non và các đối tượng nhỏ về phôi thai học. Thời gian cố định 24 h trong tối. Thành phần thuốc cố định gồm :

- axit cromic 1% : 10 phần
- Focmalin 16% : 4 phần
(Focmalin ở thị trường là 40%)
- axit axetic đá : 1 phần

Thuốc cố định được pha ngay trước khi dùng vì thuốc mau hỏng dễ phân hủy. Thuốc này có tác dụng giữ tốt nhiễm sắc thể.

b) *Thuốc cố định carnoy* (6 : 3 : 1) : Sử dụng tốt cho việc phân tích tế bào học và phôi thai học. Khi chuẩn bị cho các tiêu bản cắt lát cố định và tiêu bản ép, thời gian cố định 2 - 12 h. Thành phần thuốc cố định :

- cồn etilic tuyệt đối (100%) : 6 phần
(hoặc cồn etilic 96%).
- clorofooc : 3 phần
- axit axetic : 1 phần

Thuốc cố định này ngấm rất nhanh vào hầu hết các đối tượng nhưng tác dụng không mềm như thuốc cố định Navaxin.

c) *Thuốc cố định clarec* (3 : 1) : Được sử dụng trong các nghiên cứu tế bào học và phôi thai học để làm các tiêu bản ép. Có tác dụng giống như thuốc cố định carnoy. Mẫu vật được cố định từ 2 - 12 h, đôi khi có thể để lâu ở nhiệt độ 0 - 3°C. Thành phần thuốc cố định gồm :

- cồn etilic tuyệt đối : 3 phần
(hay cồn etilic 96%)
- axit axetic đá : 1 phần

Trong thuốc carnoy và clarec có thể thay axit axetic bằng propionic. Dưới đây là một số thuốc cố định theo kiểu đó cho đối tượng thực vật :

- + axit propionic : 1 phần
- cồn etilic 95% : 3 phần
- + axit propionic : 1 phần
- clorofooc : 4 phần
- cồn etilic tuyệt đối : 3 phần
- + Focmalin : 1 phần
- cồn etilic 95% : 15 phần
- Axit propionic : 2 phần
- + Axit propionic : 100ml
- cồn etilic 95% : 100ml
- sắt hidroxit : 0,4g

ở trường hợp 2 và 3 cứ 10ml hỗn hợp trên thêm vào vài giọt cacmin trước khi cho mẫu vật vào thuốc cố định. Thuốc cố định 3 có tác dụng trong 1 - 2h và được dùng cho cả đối tượng động vật và thực vật.

d) *Thuốc cố định Fleming* (dùng cho đối tượng nhỏ):

Axit crômíc 1%	: 25ml
Axit osmic 2%	: 5ml
Axit axetic đá	: 10ml
nước cất	: 60ml

Mẫu vật được cố định trong đó 24h rồi rửa sạch trong nước cất, sau đó đem nhuộm.

e) *Thuốc cố định Battaglia*: Được dùng trong nghiên cứu tế bào học, chia thành 2 loại:

Loại 1: (5 : 1 : 1 : 1):

Cồn etilic 96%	: 5 phần
Clorofoc	: 1 phần
Focmalin 40% (thị trường)	: 1 phần
axit axetic đá	: 1 phần

Loại 2: (5 : 5 : 1 : 1):

Cồn etilic 96%	: 5 phần
Clorofoc	: 5 phần
Focmalin 40% (thị trường)	: 1 phần
Axit axetic đá	: 1 phần

Thời gian cố định trong hai loại thuốc trên là 5 phút.

f) *Thuốc cố định Njucome* (6 : 3 : 1 : 1 : 1): Đã được sử dụng trong vài năm gần đây để nghiên cứu phân bào giảm nhiễm ở các cây ngũ cốc khi làm tiêu bản ép. Cố định các bông non, rễ non trong 24h, ở nhiệt độ phòng, sau đó thay thuốc mới và cất giữ trong tủ lạnh cho đến khi dùng. Các bao phấn của các cây ngũ cốc sau khi cố định được nhuộm bằng axeto caemin. Ngoài việc chuyên dùng để cố định các bao phấn thuốc cố định trên cũng có thể dùng để cố định các rễ con. Thành phần thuốc cố định gồm:

Cồn izo propilic	: 6 phần
Axit promionic	: 3 phần
Dioxan	: 1 phần
Ete petrol	: 1 phần
Axeton	: 1 phần

4. Cố định mẫu vật:

Trước khi cố định cần chú ý đến một số nguyên tắc chung, bởi vì kết quả tốt hay xấu là do việc thực hiện các nguyên tắc này:

- + Chọn thuốc cố định phải phù hợp với mục đích nghiên cứu.
- + Lượng dung dịch cố định phải nhiều hơn lượng mẫu từ 50 – 100 lần
- + Mẫu vật cố định (rễ non, búp hoa) phải tươi. Muốn vậy phải cố định mẫu ngay chỗ gieo trồng để tránh rễ non lộ ra nắng.
- + Đối với các mẫu vật lớn thì trước khi cố định phải cắt ra từng phần, loại bỏ những bộ phận không cần thiết (lá, lá dài, râu, gai v.v...) làm ảnh hưởng đến sự thấm thuốc vào mẫu vật nhanh chóng.

+ Cố định vào thời điểm nào trong ngày là căn cứ vào từng trường hợp cụ thể. Đối với rễ non thì cố định vào những giờ có phần bảo gián phân tối đa. Thời gian cố định còn phụ thuộc vào nhiệt độ môi trường trong ngày. Sau khi thực hiện đầy đủ các nguyên tắc trên chuyển sang cố định mẫu bằng việc thực hiện các nội dung công việc sau:

+ Để đảm bảo cho các tế bào phân chia bình thường cần phải tưới cho cây trồng trong các chậu 1 - 2h trước khi cố định và đặt chậu vào chỗ ấm, nhiệt độ không khí vào khoảng 23 - 25°C. Nếu gieo hạt trên đĩa petri thì dưới đáy đĩa cần phải để giấy thấm cho hơi nước bão hòa ở nhiệt độ 24 - 25°C trong tủ ấm 1 - 2h, trước lúc cố định.

+ Phải chuẩn bị sẵn các ống nghiệm có nút bấc và có nhãn bằng giấy đề cố định và ghi kí hiệu mẫu vật. Cỡ ống nghiệm lớn hay bé phụ thuộc vào lượng mẫu cần cố định. Trên các nhãn cần ghi rõ số kí hiệu mẫu, ngày, giờ cố định.

+ Trong sổ ghi chép về các mẫu cố định phải ăn khớp với đối tượng và công thức nghiên cứu có ghi trên các chậu, các lọ ở đồng ruộng, hoặc trên các đĩa petri. Ngoài ra trong sổ cần ghi rõ mục đích, phương pháp cố định và những tài liệu cần thiết để xử lí các kết quả thu được.

+ Các ống nghiệm sạch đã được chuẩn bị có nhãn phải đặt đúng theo công thức nghiên cứu để tránh nhầm lẫn.

+ Chuẩn bị thuốc cố định: hỗn hợp navaxin hoặc carnoy là 2 chất cố định hay dùng nhất. Ví dụ khi cố định mẫu vật trong dung dịch navaxin cần tiến hành mấy bước sau:

- Pha axit cromic 1%: lấy 1 gam anhidrit cromic hòa tan trong nước cất và cuối cùng bổ sung nước cất đến 100ml.

- Pha dung dịch focmalin 16%: lấy 16ml Focmalin thị trường (40%) đổ thêm nước cất đến 40ml.

- Lúc sử dụng trộn 10 phần axit cromic 1% với 4 phần focmalin 16% và 1 phần axit axetic, đá.

- Đổ 7 - 10ml dung dịch trên (có thể nhiều hơn tùy thuộc vào lượng mẫu cố định) vào ống nghiệm sẽ đựng mẫu vật cố định. Sau đó đưa mẫu vật vào thuốc cố định rồi nhanh chóng đem mẫu vật đang cố định vào chỗ tối tránh sự phân hủy thuốc cố định ngoài ánh sáng. Các thuốc pha trong còn có thể chuẩn bị trước một vài giờ, lúc chưa dùng bảo quản trong tủ lạnh (4°C).

- Nếu cây trồng trong chậu ta lật chậu lại, nhanh chóng dùng kéo cắt lấy rễ non và rửa sạch bằng nước lạnh (nước đã được làm lạnh trong tủ lạnh vài giờ) rồi chuyển ngay vào dung dịch cố định, khuấy rễ trong dung dịch cố định bằng đũa thủy tinh hay lắc nhẹ. Theo Lacur, khi đã cố định đủ số rễ, để lọ đựng mẫu vật dưới phễu của bơm chân không 2 - 3 phút nhằm khử sạch bọt khí làm giảm bớt khả năng ngấm của thuốc cố định.

Cần lưu ý sau khi cố định xong, mẫu vật phải được rửa và làm mất nước. Ví dụ khi dùng thuốc cố định carnoy, Navaxin qua từng thời gian nhất định phải rửa sạch mẫu vật. Dùng thuốc cố định pha trong nước và trong cồn khác nhau thì việc rửa cũng không giống nhau. Sau khi cố định bằng thuốc pha nước thì rửa mẫu vật dưới vòi nước chảy 1 - 3h cho sạch vết của thuốc.

Các đầu rễ cố định bằng hỗn hợp Navaxin thì sau khi đã rửa phải có màu xanh. Không nên rửa mẫu vật đã cố định lâu trong nước. Vì làm như vậy khi nhuộm tiêu bản nhiễm sắc thể sẽ ăn màu kềm, các mép xung quanh rễ sẽ bị tua ra. Rửa trong nước xong lại tiếp tục làm mất nước mẫu vật dần dần bằng cách cho vào cồn etlic. Để mẫu vật không bị quăn lại phải làm mất nước từ từ. Lấy mẫu vật đã rửa qua nước cho vào lọ cồn 20% trong 30 phút rồi chuyển chúng lần lượt qua cồn 40%, 60%, 80%. Mỗi lần chuyển mẫu vật được giữ lại ở mỗi nồng độ cồn trên 30 phút. Sau đó giữ mẫu vật trong cồn 80% trong các chai màu nâu có nút nhám hoặc bằng bần có gắn chặt parafin, bảo quản ở điều kiện lạnh.

Sau khi cố định bằng thuốc pha cồn thì rửa mẫu vật 3 lần, mỗi lần 1 — 2h trong cồn 80% cho đến lúc sạch mùi axit axetic. Muốn thể cần phải chuẩn bị ba lọ cồn có cùng một nồng độ, rồi nhanh chóng đưa mẫu vật đã cố định vào từng lọ cồn kế trên, mỗi lọ để mẫu vật trong đó 1 — 2h. Mẫu vật đã rửa sạch axit axetic có thể cất giữ trong cồn 70% hoặc 80%.

Cũng có thể làm mất nước nhanh trong cồn 96% nếu sau đó mẫu vật lại được xử lý tiếp tục ngay. Để khử sạch nước khỏi mẫu vật đã cố định mà mẫu vật đã để trong cồn 80%, người ta chỉ việc chuyển chúng 4 lần nữa vào cồn (hai lần trong cồn 96% và 2 lần trong cồn 100%) mỗi lần chuyển khoảng 1h.

5. Các bước chuẩn bị và làm tiêu bản cắt lát.

5.1. Tắm mẫu vật bằng chất lỏng trung gian và parafin:

Muốn có các lát cắt mỏng vài micrôn trên máy cắt lát nhất thiết phải cho mẫu vật vào parafin. Đây là một hỗn hợp hidrocarbon có nhiệt độ nóng chảy khác nhau. Đối với nghiên cứu tế bào học thì tốt nhất dùng parafin có độ nóng chảy 52 — 54°C. Parafin không hòa tan trong cồn nhưng dễ tan trong clorofoc, xilen, benzen, toluen. Parafin dùng trong nghiên cứu tế bào học phải là loại parafin trong, không có bọt, không chứa chất bần và các tạp chất khác. Bởi vậy, cần lọc lại parafin nếu chưa đạt yêu cầu. Thường trước khi dùng ta cho parafin đồng nhất nóng chảy lại trong tủ ấm 54 — 60°C một vài ngày để bay hơi hết những tạp chất. Nếu parafin bị bần cần lọc qua giấy lọc ở trong tủ ấm. Đối với vật liệu giòn cần dùng loại parafin đặc biệt cho thêm vào parafin thường 5% stearin ngoài sáp ong. Đúc mẫu vật bằng parafin chỉ tốt khi đã khử nước cẩn thận. Cho mẫu vật đã cố định trong cồn 96% và 100% vào chất lỏng trung gian (chất hòa tan parafin). Sau đó thay chất hòa tan này bằng parafin. Dưới đây là một số chất lỏng trung gian hòa tan parafin thường dùng và tính chất cơ bản của chúng.

Tên chất hòa tan	Hòa tan parafin ở t° 50°C (%)	Nhiệt độ nóng chảy (0°C)	Tính hòa tan trong cồn
Xilen	20,8	140	rất dễ
Benzen	21,5	80	rất dễ
Toluen	25,0	111	khó hòa tan
Clorofoc	25,0	61	rất dễ

Chất hòa tan tốt nhất đối với parafin trong trường hợp mẫu vật nhỏ (rễ con, nụ hoa) là clorofoc, trong trường hợp mẫu vật lớn là benzen, xilen.

Mẫu vật đã khử nước ở trong cồn không nên chuyển ngay vào parafin mà phải chuyển qua các hỗn hợp cồn tuyệt đối và clorofoc có nồng độ tăng dần từ 25 đến 100%.

- Cồn 100% + clorofoc (3 : 1) = trong 1h
- Cồn 100% + clorofoc (1 : 1) = trong 1h
- Cồn 100% + clorofoc (1 : 3) = trong 1h
- clorofoc I = trong 1h
- clorofoc II = trong 1h

Chuyển mẫu vật từ clorofoc II vào parafin như sau: Chuyển rễ con hoặc nụ hoa với cả nhãn ghi vào chén sứ nhỏ cùng với clorofoc sao cho mẫu vật nằm dưới clorofoc khoảng 3-4cm. Rót parafin đã nóng chảy vào chén đó và để vào tủ ấm ở nhiệt độ ổn định 56 - 57°C. Giữ mẫu vật trong đó khoảng vài ngày đêm. Trong thời gian này clorofoc bốc hơi còn mẫu vật thì được vùi vào parafin. Xác định sự bốc hơi hoàn toàn của clorofoc là khi đã hết mùi và parafin trong chén có vị ngọt. Cần có bộ phận điều nhiệt tốt và có tủ hút khí hay bơm hút khí độc để tránh ô nhiễm môi trường bởi hơi clorofoc.

Khi mẫu vật đã thấm parafin đổ thêm một ít parafin tinh khiết đã nóng chảy và tiếp tục để trong tủ ấm một thời gian nữa, sau đó đổ vào các hộp bằng giấy hay chén sứ để parafin đông lại ở nhiệt độ phòng. Thứ tự các công việc như sau:

- Chuẩn bị trước những hộp bằng giấy loại tốt và dày.
- Dùng pince gấp các nhãn ra ngoài sau đó đổ mẫu vật và parafin vào hộp.
- Dùng pince đã hơi nóng xếp đặt lại đầu rễ con hoặc nụ hoa vào đáy hộp cho ngay ngắn theo yêu cầu của thí nghiệm.
- Nhẹ nhàng gấp các nhãn đã viết lên mặt parafin đang nguội dần.
- Để các hộp giấy (đã đổ parafin) vào chậu nước lạnh. Parafin có chứa mẫu vật khi lấy ra khỏi hộp giấy sẽ có hình khối chữ nhật trong suốt có thể nhìn thấy mẫu vật. Mẫu vật đúc trong parafin như vậy có thể giữ được rất lâu.

5.2. Đúc khối parafin:

Có hai phương pháp đúc khối parafin:

+ Dùng lưỡi dao cạo cắt khối parafin thành từng cục nhỏ dạng khối bốn cạnh có mẫu vật ở giữa và gắn lên một đế gỗ có kích thước 1,5 x 2 x 2,5cm. Trong các khối này mẫu vật phải được định hướng nhất định và chung quanh phải có parafin dày 1-2mm.

+ Dùng « phương pháp chôn vùi » của X.G.Navaxin: Phương pháp này có kết quả khi đúc rễ con và hoa nhỏ, tiến hành qua mấy bước sau:

- Lấy những thỏi parafin đã được chuẩn bị từ trước có hình que nhỏ, dài hơn trên ngọn lửa đèn cồn cho nóng chảy rồi nhỏ giọt parafin lỏng lên mặt đế gỗ cũng đã được hơi nóng trước.

— Khi nhỏ parafin phải nhỏ vào chính giữa mặt đế gỗ, làm sao cho đường kính của giọt parafin trên đế gỗ là lớn nhất. Tiếp tục nhỏ parafin cho đến khi khối parafin có chiều cao từ 3—4mm.

— Dùng pince lấy mẫu vật đã được tẩm parafin (mẫu vật cùng parafin đã được hơ nóng từ trước trong đĩa đồng hồ), đặt vào giữa khối parafin lỏng trên giá gỗ, nhỏ thêm ít giọt parafin lỏng nữa cho kín mẫu vật, để nguội ta sẽ được khối parafin sau này đưa vào máy cắt lát.

Chú ý: việc đặt mẫu vật vào giữa khối parafin phải làm thật nhanh để tránh parafin đông đặc lại. Khi đặt xong phải dùng pince hơ nóng sửa lại mẫu vật cho ngay ngắn theo yêu cầu thí nghiệm. Xung quanh mẫu vật, parafin phải lỏng (để gắn chặt mẫu vật vào parafin), trong suốt và đồng nhất. Có như vậy khi cắt mới không bị vỡ. Khối parafin vừa nhỏ giọt xong được ngâm vào chậu nước lạnh, sau khi nguội hẳn dùng dao trích hay lưỡi dao bào gọt xung quanh, chỉ chừa lại khối parafin chứa mẫu vật trong dạng khối chữ nhật hay khối hình thang cân.

Khối đã cắt gọt xong có thể đưa lên máy cắt lát.

5.3. Cắt mẫu vật trên máy cắt lát:

Máy cắt lát có 2 loại: kiểu bàn trượt và kiểu quay tay. Phổ biến nhất là máy cắt kiểu bàn trượt. Ngoài hai loại máy trên hiện nay còn có máy cắt lát đông lạnh. Sau đây xin giới thiệu thứ tự các bước tiến hành khi làm việc với máy cắt lát kiểu bàn trượt.

— Lau sạch bụi và phoi parafin trên máy cắt lát, bôi vazolin vào bộ phận chuyển động cho trơn. Đặt đèn vào buồng có máy cắt lát để hơ nóng lưỡi dao và khối parafin trong mùa lạnh.

— Lưỡi dao đã mài sắc kiểu mặt bằng. Mặt lồi để thành một góc nghiêng nhất định sao cho mép dao song song với mặt khối parafin và thẳng góc với hướng chuyển động. Trong khi cắt phải lau sạch lưỡi dao bằng giẻ tẩm xilen.

— Kẹp chặt giá gỗ có parafin vào bàn kẹp mẫu vật để có thể cắt được lát cắt ngang hoặc lát dọc. Cần thận tiếp cận mép lưỡi dao với mặt trên của khối parafin.

— Dùng ốc vít cấp xác định độ dày của lát cắt tùy theo đối tượng và mục đích nghiên cứu.

— Bắt đầu cắt khối parafin: nâng giá kẹp mẫu vật ở mặt trước dao lên bằng chiều dài lát cắt. Sau đó kéo bàn trượt với cả lưỡi dao về phía mình ta cắt được một lớp đúng theo yêu cầu. Cứ như thế cắt tiếp các lát cắt còn lại. Trong quá trình cắt, nếu lưỡi dao kêu chứng tỏ góc nghiêng của dao chưa đạt yêu cầu cần phải điều chỉnh lại.

Lấy các lát cắt khỏi dao bằng chổi lông mềm và đặt lên đáy mặt đen của hộp dài nhưng không sâu. Chú ý đặt nhãn vào kẻ lằn. Sau đó dán các tiêu bản lên lam kính. Sau khi sử dụng cần lau sạch máy cắt lát và bảo quản dao cắt.

5.4. Những thiếu sót khi làm lát cắt:

— Lát cắt bị vỡ và gắn vào lưỡi dao, điều này do 2 nguyên nhân: nhiệt độ trong buồng cắt quá cao; đục mẫu vật bằng parafin quá mềm. Điều đó có

thể khắc phục bằng cách điều chỉnh lại nhiệt độ phòng, đúc mẫu vật lại bằng parafin cứng hơn.

— Lát cắt vụn do 2 nguyên nhân: Nhiệt độ trong buồng cắt quá thấp, parafin quá cứng, đông lạnh trong thời gian đúc khối chậm.

— Lát cắt xếp thành dải dọc theo lưỡi dao do nguyên nhân lưỡi dao bị mẻ.

— Các lát cắt lật khỏi lưỡi dao xếp ngược lại, do mặt dưới lưỡi dao bần.

— Băng parafin bị uốn cong lại, do mép trước và mép sau của khối parafin không song song với mép cắt của dao.

— Máy cắt lát cắt sót, hoặc lát cắt có độ dày không đều nhau: Do dao cắt đặt quá thoải, cần phải sửa lại độ nghiêng của dao.

— Các lát cắt bị lượn sóng. Do khối đúc không tốt. Cần phải đúc lại khối parafin.

— Khi cắt trên máy cắt lát mẫu vật bị rơi khỏi khối có thể do một trong 3 nguyên nhân sau:

Mẫu vật ngấm parafin kém,

Lúc để tủ ấm mẫu vật ngấm parafin hơi mềm hơn parafin dùng để đúc khối hoặc lưỡi dao cắt bị cùn.

5.5. Dán các lát cắt có parafin:

Sau khi chuẩn bị tốt các lam kính ta tiến hành dán các lát cắt. Có thể dán các lát cắt bằng nhiều phương pháp:

a) Dùng nước cất bình thường, cũng cho kết quả tốt, nhưng lam kính phải sạch tuyệt đối. Nhỏ lên lam kính vài giọt nước, dùng dao mổ cắt bằng parafin thành từng đoạn rồi chuyễn các đoạn cắt lên lam kính, để mặt sáng của lát cắt tiếp xúc trực tiếp với nước. Sau đó chuyễn lam kính để tiêu bản lên bàn kính loại chuyễn dùng hơi nóng tiêu bản bằng điện, hay bằng đèn cồn các lát cắt parafin sẽ phẳng lại. Nếu không có bàn hơi nóng có thể dùng lưới amian đối nóng. Khi hơi nóng chú ý không để parafin chảy lỏng trên mặt nước và điều chỉnh sao cho lát cắt nằm giữa lam kính sau đó dùng giấy lọc hút hết nước thừa, dùng dao mổ và pince sửa lại các lát cắt cho nằm sát nhau ngay ngắn rồi tiếp tục hút khô nước.

Đánh dấu và đặt các tiêu bản đã hút khô nước vào 1 hộp giấy cứng, rồi đặt hộp vào tủ ấm 40°C. Cần chú ý rằng nếu chỉ để các tiêu bản ở điều kiện nhiệt độ phòng thì sau đó những lát cắt sẽ bị rơi khỏi kính.

b) Phương pháp dùng lòng trắng trứng (anbumin):

+ Chuẩn bị lòng trắng trứng: cho thêm vào lòng trắng trứng một lượng glixerin bằng lượng lòng trắng trứng, sau đó lắc đều và lọc hỗn hợp. Thêm vào hỗn hợp trên các tinh thể timol hoặc phenol để chống mốc.

+ Dán các lát cắt bằng anbumin có 2 cách: dán khô và dán ướt. Lúc dán khô thì nhỏ một giọt hỗn hợp anbumin – glixerin lên lam kính rồi dùng đầu ngón tay hoặc dùng khăn vải mềm dàn đều thành một lớp mỏng. Dùng chổi lông đưa các lát cắt lên lam kính. Sau đó hơi nóng lam kính đã có các lát cắt và tiếp tục xử lí các giai đoạn còn lại.

Apati có đề nghị hòa hỗn hợp anbumin – glixerin vào nước cất (1 giọt hỗn hợp với 4ml nước cất). Dùng ống nhỏ giọt đưa hỗn hợp đã pha nước trên lên lam kính và đặt các lát cắt lên. Sau đó làm thẳng các lát cắt trên bàn làm nóng, thấm nước thừa và đưa sấy khô ở nhiệt độ 40°C trong tủ ẩm. Đó là dán ướt.

5. 6. Khử parafin và nhuộm các lát cắt:

a) *Khử parafin*: Sau khi dán các lát cắt lên lam kính ta khử bỏ parafin theo các bước sau:

- Dùng xilen đẩy parafin ra khỏi các lát cắt.
- Cho vào cồn 90% để tẩy sạch xilen.
- Rửa các lát cắt trong nước để tẩy cồn.
- Rửa thêm để tẩy sạch parafin.
- Nhuộm màu và rửa tiêu bản.
- Làm phân hóa mẫu và rửa.
- Khử nước cho các lát cắt bằng cồn 96% và 100%.
- Thay cồn bằng xilen.

b) Các phương pháp nhuộm tiêu bản:

+ *Nhuộm bằng tím genxian* (theo Newton). Phương pháp nhuộm tiêu bản bằng tím genxian là một phương pháp nhuộm nhanh, thường được áp dụng trong các nghiên cứu tế bào học, phôi thai học và di truyền học. Bằng phương pháp này, nhiễm sắc thể được nhuộm màu tím, còn các thành phần khác hầu như trong suốt. Trình tự công việc được tiến hành như sau:

- Nhúng lam kính có các lát cắt vào xilen I 10 – 30 phút, sau đó chuyển sang xilen II trong 5 – 6 phút.

- Dùng cồn 96% rửa tiêu bản bằng ống nhỏ giọt, sau đó đưa ngâm tiêu bản trong cồn 96% 10 – 15 phút.

- Rửa tiêu bản bằng nước cất 3 – 5 phút.

- Nhúng lam kính có các lát cắt vào dung dịch tím genxian 1% (1 gam tím genxian nguyên chất pha trong 100ml nước cất) trong 5 – 15 phút tùy theo đối tượng.

- Rửa lại lam kính có tiêu bản trong nước cất khoảng 3 – 5 giây.

- Nhúng lam kính có tiêu bản vào dung dịch gồm 1 gam iốt và 1 gam kali iôđua trong 100ml cồn 80% (nếu không có cồn dùng nước cất) trong thời gian 30 phút.

- Rửa lam kính có tiêu bản bằng cồn 96% và để trong cồn 96% khoảng 2 – 3 giây.

- Rửa lam kính có tiêu bản bằng cồn 100%, rồi để trong cồn 100% khoảng 2 – 3 giây. Nếu tiêu bản nhiều nước thì có thể để lâu hơn.

- Tiến hành phân hóa bằng dầu cầm chướng hoặc nếu không có dầu cầm chướng thì thay bằng cacbonxilon (Hòa 70 – 80 ml xilen với 20 – 25 ml phenol đã nóng chảy. Làm nóng phenol trong bình cầu trên bếp đun cách thủy. Cũng có thể phân hóa trong hỗn hợp dầu cầm chướng và xilen theo tỉ lệ 1 : 1).

– Nhúng lam kính có tiêu bản vào xilen III khoảng 3 – 5 giây rồi cho vào xilen IV khoảng 3 phút.

Phương pháp vừa nêu trên rất thích hợp cho việc đếm các nhiễm sắc thể dài xếp chồng lên nhau.

+ *Nhuộm tiêu bản bằng Axeto cacmin*: (theo N.V.Favorski). Có 2 phương pháp chính:

Phương pháp 1: qua mấy bước sau:

– Nhỏ 1 – 2 giọt axeto cacmin 3% lên tiêu bản cắt lát đã khử parafin bằng xilen và rửa sạch bằng nước cất trong 3 – 5 phút, kết hợp với việc hơi nhẹ trên ngọn lửa đèn cồn vài lần.

– Rửa tiêu bản đã nhuộm bằng nước để loại bỏ axeto cacmin còn thừa, rồi phân hóa trong dung dịch amiac thị trường 0,5% dưới kính hiển vi.

– Rửa lại tiêu bản trong nước cất 5 phút rồi khử nước trong cồn 90% và 100%.

– Chuyển tiêu bản qua xilen rồi dán bằng keo canada.

Phương pháp 2: qua mấy bước sau:

– Các lát cắt sau khi đã khử parafin bằng xilen và rửa sạch bằng nước cất như phương pháp trên, đưa nhuộm bằng axeto cacmin 5 phút.

– Rửa mẫu vật đã nhuộm bằng nước cất, rồi chuyển vào dung dịch phen sát – amoni 3 – 5% và hơi nóng trên ngọn lửa đèn cồn cho đến lúc bốc hơi.

– Chuyển mẫu vật rửa lại trong nước cất, rồi khử nước trong cồn 90% và 100%.

– Chuyển tiêu bản vào xilen.

Nhiễm sắc thể nhuộm theo phương pháp này thì có màu đen.

Ngoài các phương pháp nêu trên người ta còn dùng nhiều phương pháp khác để nghiên cứu hình thái và đếm số lượng nhiễm sắc thể như phương pháp của I.A.Ellengorm (1947) có thể thấy được sự khác biệt về màu sắc của nhiễm sắc thể ở các dạng bố mẹ. Phương pháp này chuyên dùng để nghiên cứu bộ nhiễm sắc thể của các cây lai xa. Các mẫu vật được cố định bằng thuốc carnoy, tẩy bằng phen sát – amoni và nhuộm bằng hematoxin. Sau khi đã phân hóa tiêu bản màu sắc nhiễm sắc thể của bố mẹ trong các cây lai khác nhau. Ví dụ như trong trường hợp cây lai tạo ra khi lai giữa mạch đen với cỏ băng thì nhiễm sắc thể mạch đen trong cây lai ở dạng đơn trị có màu đen, còn nhiễm sắc thể của cỏ băng thì lại có màu xám. Các lát cắt trên cũng có thể sử dụng để nghiên cứu axit nucleic sẽ được đề cập tới trong chương 2.

5.7. Dán tiêu bản.

– Dùng pince đưa các tiêu bản ra khỏi xilen, lau sạch mặt dưới và đặt lam kính lên chỗ bằng phẳng có lót giấy trắng.

– Nhỏ lên các lát cắt một giọt keo canada và 1 giọt xilen tinh khiết.

– Đậy la men (chú ý tránh bọt khí), dùng giấy thấm hút hết xilen và keo canada còn thừa.

– Sấy khô tiêu bản trong vài ngày. Lau sạch lại tiêu bản và ghi nhãn rồi đưa vào hạo quản chỗ khô ráo.

6. Những nguyên tắc và phương pháp chuẩn bị tiêu bản ép:

6.1. Cố định, cất giữ và làm mủn tiêu bản.

Hiện nay các tiêu bản ép rất được thông dụng trong nghiên cứu hiển vi vì tránh được nhiều giai đoạn phức tạp của phương pháp cắt lát. Các tiêu bản ép được sử dụng để nghiên cứu phân bào gián phân, giảm phân cấu tạo và hình thái nhiễm sắc thể trên đối tượng thực vật và động vật.

Thuốc cố định được dùng phổ biến nhất để chuẩn bị tiêu bản ép là carnoy, cồn etilic, Njucome, v.v.. Đối với trường hợp nhiễm sắc thể quá dài thì dùng phương pháp đặc hiệu để xử lý làm cho nhiễm sắc thể co ngắn lại. Ví dụ để phân tích nhiễm sắc thể cây *trepis capillaris* thì trước khi cố định phải xử lý rễ con trong dung dịch consixin với nồng độ 0,01 – 0,05% trong khoảng 2h. Trong nhiều trường hợp xử lý consixin còn được bổ sung bằng việc xử lý hỗn hợp dung dịch đậm đặc paradichlorobenzen và 8 – oxiquinolin 0,002M (1 : 1) trong 2h. Hai dung dịch này được pha trong tủ ấm ở nhiệt độ 60°C. Ngoài việc xử lý các chất trên hiện nay người ta còn dùng dung dịch monobrom naptalin bão hòa trong nước để xử lý các rễ non. Mẫu vật được cố định trong các dung dịch trên được chuyển giữ trong cồn 70% hoặc 80% ở điều kiện lạnh (4°C).

Các phương pháp làm mủn các mô có ý nghĩa rất lớn khi chuẩn bị các tiêu bản ép. Để làm mủn người ta thường dùng axit axetic 45%, axit propionic 40 – 45%, cloranhidrat, axit clohidric 1N, các enzym (như xitaza), v.v.. Rozen đã dùng phương pháp sau để làm mủn đối tượng. Chuẩn bị hỗn hợp axit clohidric đậm đặc và cồn etilic 95% theo các tỉ lệ: 1 : 4, 1 : 2, 1 : 1 tùy theo đối tượng. Đối với đối tượng mềm dễ làm mủn thì dùng tỉ lệ 1 : 4. Làm lạnh chất làm mủn đến 10–15°C rồi bỏ đối tượng nghiên cứu vào trong đó khoảng 5–20 phút, sau đó rửa mẫu vật qua nước lạnh 30 phút–2h rồi chuyển đối tượng lên kính để tiêu bản, nhỏ 1 giọt nigrozin 4% ở nhiệt độ 18–20°C trong 2–3 phút. Sau khi làm mủn, các tiêu bản được nhuộm bằng các thuốc nhuộm thông thường như axetocacmin 3–5%, axetocxein, axeto lacmoit, thuốc thử chiff, v.v..

6.2. Nhuộm các tiêu bản bằng axeto cacmin, axeto ocxein, axeto lacmoit, xanh metilen, Giemsa.

Các thuốc nhuộm trên không phải có sẵn mà trước khi dùng ta phải tiến hành pha chế theo một qui trình nhất định.

a) *Pha dung dịch axeto cacmin*: Phương pháp phổ biến nhất là lấy 1 gam (đôi khi 2 gam hoặc hơn nữa tùy nhu cầu thí nghiệm) cacmin hòa vào 45ml axit axetic đá và 55ml nước cất. Tất cả cho vào bình cầu có thiết bị làm nguội. Bình cầu được đặt trên bếp đun cách thủy trong 30 – 60 phút. Trong trường hợp không có thiết bị làm nguội thì đặt một ống thông lên bình cầu qua một lỗ nhỏ trên nút. Đun xong để nguội và lọc trên phễu giấy lọc. Dung dịch được lọc xong đổ sang chai nâu đậy nút nhám cho vào tủ lạnh. Cặn cacmin còn thừa lại trên giấy lọc có thể sử dụng lại được. Có nhiều trường hợp thuốc nhuộm cacmin được chuẩn bị trong cồn etilic có thêm HCl như sau: Lấy 4 gam cacmin hòa vào 15ml nước nóng cho thêm 1ml HCl. Để nguội rồi đổ vào 95ml cồn 85% và lọc (phương pháp V. Sno 1963).

b) *Pha dung dịch axeto ocxein*: Hòa một gam ocxein vào 45ml axit axetic loãng, rồi làm lạnh. Sau đó cho thêm 55ml nước cất. Lắc nhẹ, lọc và bảo quản trong lọ nâu có nút nhám.

c) *Pha axeto lacmoit*: Cân 2 gam lacmoit hòa vào 100ml axit axetic 45% đem đun sôi 2 giờ trong bình cầu có thiết bị ngưng lạnh. Sau khi bốc hơi cho thêm axit axetic cho đến khối lượng ban đầu rồi lọc và bảo quản trong lọ nâu có nút nhám.

d) *Pha xanh metilen*: Lấy 100 – 500mg xanh metilen hòa vào 100ml nước cất.

Cần lưu ý là khi dùng các loại thuốc nhuộm trên thì mẫu vật được cố định trong cồn axetic theo tỉ lệ 3:1.

e) *Phương pháp chuẩn bị tiêu bản ép*: Có thể thực hiện qui trình làm tiêu bản qua mấy nội dung công việc sau:

- Cố định mẫu vật trong cồn axetic vài giờ.
- Rửa mẫu vật trong cồn 70% hoặc 80% cho đến lúc hết mùi axit axetic.
- Cất giữ mẫu vật trong cồn 70% (nếu chưa dùng hết).
- Rửa mẫu vật trong nước.
- Làm mủn mẫu vật trong HCl 1N ở nhiệt độ 60°C vài giây hoặc vài phút tùy theo đối tượng nghiên cứu.
- Rửa mẫu vật lại trong nước để loại trừ HCl còn thừa và các cặn bẩn.
- Nhuộm tiêu bản trong các thuốc nhuộm trên khoảng 3 – 5 phút. Có những trường hợp rễ khó làm mủn thì thời gian nhuộm lâu hơn như các rễ hòa thảo.

Khi dùng axeto ocxein, axeto cacmin, axeto lacmoit cần phải hơi nóng tiêu bản trên đèn cồn cho đối tượng sôi nhẹ vài lần để làm mủn mẫu vật và hóa chất thấm nhanh chóng hơn vào nhân tế bào (rất cần thiết trong trường hợp không làm mủn tiêu bản bằng HCl).

– Cho mẫu vật đã nhuộm lên lam kính, nhỏ vào đấy một giọt axit axetic 45% hoặc cloranhidrat (5g cloranhidrat hòa trong 2ml nước cất), gạt bỏ các mô thừa, đập la men (tránh để bọt khí) rồi lấy đầu que điện thông có thuốc dầm nhẹ từ trong ra ngoài, tiêu bản được dần mỏng.

Ngoài phương pháp giới thiệu trên trong một số trường hợp cũng có những thay đổi. Ví dụ người ta có thể cất giữ mẫu vật đã cố định trong thuốc cố định mới ở nhiệt độ 0 – 3°C, nhuộm và làm mủn đối tượng trong hỗn hợp axeto ocxein 2% và HCl 1N với tỉ lệ 9:1 kết hợp với đun nóng. Hoặc có thể dùng axeto lacmoit 4% và HCl 1N theo tỉ lệ 9:1 để làm mủn mẫu vật rồi nhuộm bằng axeto lacmoit (theo La Cur). Một số tác giả khác như Mac Klintoc và Benling lại thông báo rằng có thể cất giữ mẫu vật đã cố định trong cồn 70% ở nhiệt độ 0 – 3°C và nhuộm bằng axeto cacmin có thêm sắt cũng cho hiệu quả tốt. Có thể thay chất làm mủn mẫu vật HCl bằng axeto cacmin hay axeto ocxein với thời gian để mẫu trong các dung dịch này khoảng một đêm. Còn đối với axeto lacmoit muốn làm mủn mẫu vật cần phải để trên 2 ngày.

Trên đối tượng động vật chúng ta thường nhuộm tế bào bằng thuốc nhuộm giemsa – Dùng 4,6 gam giemsa, đưa tán nhỏ thành bột cho vào 250 ml glixerin

và 750ml cồn 99% hòa tan trong lọ thủy tinh màu nâu để trong tối, pha dung dịch mẹ giemsa này trước một tháng. Trước khi dùng đưa lọc cạn qua phễu lọc rồi tiến hành pha loãng theo tỉ lệ 1:4 bằng nước cất. Nhuộm tiêu bản trong 30-40 phút. Nếu nhạt, nhuộm thêm. Sau đó nếu tiêu bản còn bám nhiều mỡ ta rửa bằng cồn 30% rồi dội qua nước nóng.

6.3. Nhuộm tiêu bản bằng axeto fucxin, lacmoit, propionic:

a) *Nhuộm tiêu bản bằng axeto fucxin*: lấy 1 gam fucxin bazic hòa vào 50 ml axit axetic 40%. Đun nóng dung dịch đến 50°C để fucxin tan ra hết, sau đó làm lạnh đến 25 - 30°C và lọc bằng giấy lọc. Các đối tượng được cố định trong axit axetic 45% khoảng 10 - 30 phút ở nhiệt độ 15°C. Rồi làm mủn trong HCl 1N khoảng 10 - 30 giây ở nhiệt độ 60°C.

Nhuộm mẫu vật bằng axeto fucxin trong các lọ con có nút đậy kín 1 - 3 giờ. Đối với tiêu bản ép được chuẩn bị trong axit axetic 30% là hóa chất có khả năng làm sáng tế bào chất. Nhiễm sắc thể trong trường hợp này nhuộm màu tím đậm.

b) *Nhuộm tiêu bản bằng lacmoit propionic*: Để nhuộm các tiêu bản tạm thời của rễ non, bao phần thực vật có thể chuẩn bị hợp chất có thành phần sau đây: 5 gam lacmoit cho vào 50 ml axit propionic 50%. Đặt dung dịch này vào chỗ tối kháng 3 - 5 ngày và thường xuyên lắc đều. Sau đó lọc và dùng để nhuộm như một dung dịch chuẩn. Cho các đầu rễ dài 2-4 mm vào các ống nghiệm đáy bằng đã đựng sẵn 5 - 10 giọt dung dịch chuẩn, ngâm trong 2 giờ. Sau đó chuyển đầu rễ vào 0,5 ml axit propionic 40% và đun sôi từ từ trong khoảng 5 - 30 giây để làm mủn đối tượng. Chuyển rễ lên lam kính sạch, nhỏ thêm một giọt axit propionic 40%. Đậy lam kính lại và ép nát tiêu bản. Theo X.G. Kaplar thì đếm nhiễm sắc thể ở các tế bào của chóp rễ non thích hợp nhất không phải ở vùng phân chia mạnh mà ở những tế bào phân chia tiếp sau nằm ở xung quanh tiêu bản. Cần lưu ý rằng nhiễm sắc thể nhuộm bằng phương pháp này có màu nâu. Để nâng cao độ tương phản của nhiễm sắc thể người ta thường nghiên cứu trên các tiêu bản đã chuẩn bị trước đó khoảng 30 phút.

6.4. Nhuộm tiêu bản bằng thuốc thử Schiff:

Có hai kiểu tiến hành phản ứng, Feulgen để thể hiện ADN: thủy phân lạnh và thủy phân nóng các đối tượng trong axit clohidric.

a) *Thủy phân lạnh*:

- *Chuẩn bị thuốc thử Schiff*: thuốc thử Schiff gồm 97,5 ml nước cất, 2,5 ml axit clohidric đậm đặc, 0,5 gam fucxin bazic, 1,5 gam kalimetadisunfit ($K_2S_2O_5$) hoặc natri metadisunfit ($Na_2S_2O_5$). Hòa tan các chất này vào lọ theo thứ tự trên, không lắc, đậy kín để trong tối 2 ngày đêm. Muốn khử màu của dung dịch nhanh ta cho thêm 1,5 gam than hoạt tính và lọc bằng giấy lọc. Kết quả được dung dịch trong suốt không màu. Dung dịch này được bảo quản trong lọ nâu, để ở điều kiện lạnh (0-4°C).

- *Nhuộm tiêu bản*: mẫu vật sau khi cố định và giữ trong cồn 70% được chuyển rửa trong nước cất, rồi đưa thủy phân trong HCl 50% ở nhiệt độ phòng. Thời gian thủy phân rễ trong HCl từ 20 phút đến 2h tùy theo đối tượng nghiên cứu. Chúng tôi đã cải tiến quy trình thủy phân rễ lúa như sau:

Trước khi thủy phân trong HCl 50% từ 25 – 30 phút rồi được đưa vào HCl 1N khoảng 3 – 5 phút. Sau khi thủy phân mẫu vật được nhuộm trong thuốc thử Schiff-2h (trong tủ lạnh) hoặc 1h30 phút (ở nhiệt độ phòng). Thời gian này nói chung còn tùy thuộc vào từng đối tượng nghiên cứu, sau khi nhuộm, mẫu vật được chuyển vào axit axetic 45% rồi làm tiêu bản để quan sát.

b) *Thủy phân nóng*: Về nguyên tắc thuốc thử Schiff cũng được chuẩn bị theo phương pháp trên. Các bước thực hiện thủy phân nóng như sau:

— mẫu vật được chuyển từ cồn 70% sang HCl 1M lạnh trong vài giây, sau đó chuyển sang HCl 1N ở nhiệt độ 50°C trong 3 – 5 phút để thủy phân nóng (đối với mẫu vật cố định trong dung dịch carnoy) hoặc 6 – 8 phút trong dung dịch cố định cồn axetic.

— Chuyển lại mẫu vật vào HCl 1N lạnh trong vài giây.

— Chuyển mẫu vật vào thuốc thử Schiff trong 30 phút đến 1h.

— Rửa mẫu vật trong nước sunfuro I, II, III mỗi loại 5 – 10 phút (nước sunfuro I, II, III thực chất có cùng 1 nồng độ được pha như sau: cho 10ml dung dịch natri bisunfit 20% (NaHSO_3) và 10ml HCl 1N vào 200ml nước cất và lắc đều.

6.5. Chuẩn bị tiêu bản lấy từ mô phân sinh đầu ngọn, lá non.

a) *Chuẩn bị tiêu bản lấy từ mô phân sinh đầu ngọn*: Các cây thuộc họ hòa thảo rễ cứng khó ép mỏng, tế bào chất lại bắt màu axeto cacmin rất mau. Vì vậy rất khó phân biệt giữa nhân và tế bào chất. Trong trường hợp này có thể nghiên cứu phân bào gián phân và hình thái nhiễm sắc thể ở mô phân sinh đầu ngọn bằng cách lấy chóp lá mầm của các hạt mới nảy mầm xử lý dung dịch consixin với nồng độ 0,3% và dung dịch paradi clorobenzen trong 3 giờ. Cố định mầm trong cồn axetic theo tỉ lệ 3:1. Sau đó cho mẫu vật qua các dung dịch cồn 80%, 50%, 30%, rửa qua nước và nhuộm bằng thuốc thử Schiff.

b) *Phương pháp chuẩn bị tiêu bản lấy từ lá non*. Thường dùng thuốc cố định cồn axetic để cố định các lá non đang sinh trưởng mạnh nhất. Sau khi cố định xong rửa và cất giữ mẫu vật trong cồn 70%. Khi nhuộm bỏ các lá non đã cố định vào axeto cacmin hoặc axeto ocxein rồi đun sôi vài lần. Chuyển các lá non đã nhuộm lên lam kính, nhỏ vào tiêu bản vài giọt axit axetic 45%. Dùng kim phân tích tách lấy phần gốc lá là nơi có phân bào mạnh nhất, loại bỏ các phần còn lại. Dùng lamén lại ép nhẹ tiêu bản để dàn mỏng các tế bào, rồi quan sát tiêu bản trên kính hiển vi. Phương pháp này có thể dùng để làm tiêu bản đếm số lượng nhiễm sắc thể trên các cây trồng. Cần chú ý để có thể bắt gặp nhiều tế bào đang ở giai đoạn metaphase bằng cách trước khi cố định có thể xử lý thêm dung dịch consixin với nồng độ 0,2% trong 1 – 2 giờ (theo Mayer). Ngoài ra muốn nghiên cứu nhiễm sắc thể, trước khi cố định, cho các lá tươi vào dung dịch esculin đậm đặc 15 – 24 giờ ở nhiệt độ 10 – 12°C. Sau đó mới cố định trong cồn axetic từ 3 – 24 giờ. Mẫu vật đã cố định xong cho vào hỗn hợp axeto ocxein 2% và HCl 1N theo tỉ lệ 9:1 để làm mủn và nhuộm tiêu bản. Tiếp theo hơi nóng trên ngọn lửa đèn cồn khoảng vài giây, rồi lại cho vào dung dịch trên ở nhiệt độ 30°C trong 30 phút. Cuối cùng chuyển mẫu vật lên lam kính và nhuộm bằng một vài giọt axeto ocxein 1% dùng lamén lại và ép tiêu bản.

6.6. Phương pháp chuẩn bị nhanh tiêu bản ép.

Daier và một số tác giả khác đã nêu ra phương pháp để chuẩn bị nhanh tiêu bản ép theo các bước sau:

– Chuẩn bị một hỗn hợp dung dịch cố định: cồn etilic, axit axetic, clo-rofooc và focmalin theo tỉ lệ 10 : 2 : 2 : 1.

– Cố định mẫu vật trong dung dịch trên trong 5 phút.

– Làm mủn mẫu vật bằng HCl 1N ở nhiệt độ 50°C từ 3 – 5 phút tùy từng đối tượng.

– Nhuộm mẫu vật trong hỗn hợp ocxein, axit lactic và axit propionic 2 – 5 phút (hỗn hợp được pha như sau: 2 gam ocxein hòa tan vào 100ml hỗn hợp axit lactic và axit propionic 45% với tỉ lệ thể tích bằng nhau).

6.7. Chuyển tiêu bản tạm thời thành tiêu bản cố định.

Tùy thuộc vào điều kiện của các phòng thí nghiệm có thể dùng một trong ba phương pháp sau để chuyển tiêu bản tạm thời thành tiêu bản cố định.

a) *Phương pháp 1*: hóa chất được dùng phổ biến trong phương pháp này là axit cacbonic rắn. Đề tiêu bản ép đã chuẩn bị lên mặt phẳng của axit cacbonic rắn 1 – 1,5 phút. Lúc này lam kính trở nên bất động. Dùng lưới dao mỏng cẩn thận tách lamen ra khỏi lam kính. Sau đó tiêu bản được khử nước bằng cồn etilic 96% trong 5 phút, rồi chuyển sang cồn 100% trong 7 phút. Cho qua xilen I và xilen II mỗi loại 5 phút. Dán tiêu bản bằng keo canada trên lam kính sạch. Trước khi cho vào xilen đôi khi người ta còn cho vào hỗn hợp cồn etilic tuyệt đối và xilen. Cần lưu ý trong trường hợp không có cồn etilic có thể dùng cồn butilic loại thường hoặc izobutilic.

b) *Phương pháp 2*: Sử dụng nitơ lỏng. Người ta cho vào bình nitơ lỏng một thanh nhôm có bàn tròn con ở trên (bàn này bị lạnh xuống rất nhanh). Đề tiêu bản lên bàn lạnh. Sau đó lamen bị tách ra khỏi lam kính. Tiêu bản lần lượt được chuyển vào hệ thống các dung dịch theo thứ tự và thời gian ấn định như trong phương pháp 1, rồi dán keo canada.

c) *Phương pháp 3*: Nếu không có nước đá khô và nitơ lỏng có thể sử dụng phương pháp đơn giản hơn để tách lamen. Muốn tách lamen khỏi lam kính để tiêu bản nhuộm bằng axetocacmin thì dùng axit axetic 10%. Đổ axit axetic vào đĩa petri trong đó có đặt 2 que diêm. Lộn ngược lam kính để tiêu bản cho lamen xuống dưới. Sau 10 – 15 phút lamen tự tách ra, nhanh chóng đưa lam kính vào thuốc cố định cồn axetic, rồi lần lượt chuyển lam kính vào các dung dịch theo đúng thứ tự và thời gian đã nêu trong phương pháp 1.

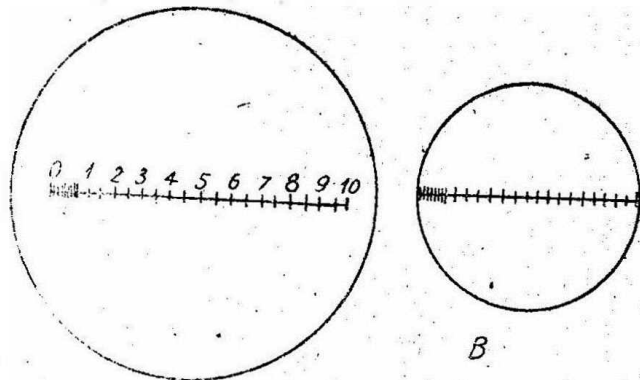
Nên nhớ rằng để chuyển tiêu bản thành công, lam kính phải rất sạch, nếu không khi chuyển mẫu vật sẽ bị rửa trôi không còn giữ lại trên lam kính nữa. Trong những trường hợp thật cần thiết mà công việc chuẩn bị lam kính và lamen chưa thật đạt tiêu chuẩn, thì sau khi tách lamen và lam kính có thể cố định cả lamen và lam kính rồi phát hiện chỗ có tiêu bản để giữ lại.

7. Sử dụng trắc vi thị kính, trắc vi vật kính và gương vẽ.

7.1. Sử dụng trắc vi thị kính, trắc vi vật kính.

Trong thực tế khi đo kích thước các vật thể hiển vi: hạt phấn, ống phấn, phôi, nhiễm sắc thể v.v... nhất thiết phải sử dụng những cái thước đặc biệt gọi là trắc vi thị kính, trắc vi vật kính.

Đề đo tiêu bản dưới kính hiển vi thì dựa vào thước khắc của trắc vi thị kính. Đó là một bản kính tròn trên đó có một thước khắc gồm 100 vạch bằng nhau (hình 1). Trắc vi thị kính có thể nằm trong bộ phụ tùng của kính hiển vi với thị kính hoặc nằm riêng lẻ: xoay thị kính đưa vật phải đo vào thước khắc của trắc vi thị kính và bắt đầu đo vật. Nhưng do giá trị của một vạch trên trắc vi thị kính là khác nhau tùy theo chỗ chúng ta quan sát tiêu bản với vật kính nào. Vì vậy để chuyển trị số đo được dưới trắc vi thị kính thành kích thước thật của đối tượng nghiên cứu thì phải sử dụng trắc vi vật kính. Thông thường nó được lắp vào một khung kim loại. Thang của nó có chiều dài 1mm và chia thành 100 vạch bằng nhau. Kích thước của một vạch là $10\mu\text{m}$ ($0,01\text{mm}$).



Hình 1

A - Thang thước của trắc vi thị kính.
B - Thang thước của trắc vi vật kính.

Khi sử dụng trắc vi thị kính và trắc vi vật kính để đo tiêu bản có thể tiến hành tuần tự qua mấy bước sau:

- Đưa trắc vi thị kính vào thị kính của kính hiển vi. Nhìn vào thị kính xoay thấu kính mắt để nhận rõ ảnh của thang khắc.

- Đặt tiếp tiêu bản nghiên cứu lên mâm hình hiển vi, qua thị kính, dùng bộ điều chỉnh tiêu bản dịch đối tượng và xoay trắc vi thị kính để có thể đo được kích thước của vật thể qua thang khắc tương ứng với bao nhiêu vạch của trắc vi thị kính. Cần lưu ý đến độ phóng đại của vật kính và thị kính được sử dụng đối với từng loại kính hiển vi.

- Lấy tiêu bản ra, đặt trắc vi vật kính lên mâm kính (loại thường dùng có kí hiệu OMP). Qua thị kính nhìn rõ ảnh của thang khắc trên trắc vi vật kính tiếp tục điều chỉnh kính sao cho ảnh của thang khắc trắc vi vật kính trùng với ảnh của thang khắc trắc vi thị kính. Sau đó xác định số lượng vạch của trắc vi vật kính và trắc vi thị kính trùng khít lên nhau là bao nhiêu? Tốt nhất là điều chỉnh sao cho trùng nhau từ điểm số không ở đầu thước khắc.

- Chia đại lượng thứ nhất (số vạch trùng nhau của trắc vi vật kính), cho đại lượng thứ hai (số vạch trùng nhau của trắc vi thị kính) và nhân kết quả nhận được với 10 (kích thước mỗi vạch của trắc vi vật kính tính bằng $10\mu\text{m}$). Ta được giá trị của một vạch của trắc vi thị kính.

– Xác định kích thước thật của vật thể nghiên cứu bằng cách lấy kích thước của vật thể tính theo số vạch trên trắc vi thị kính tính bằng micromet.

Để tiện theo dõi xin nêu dưới đây công thức tổng quát để tính toán kích thước thật của vật thể nghiên cứu qua kính hiển vi:

– Nếu gọi A là số vạch của trắc vi vật kính trùng với số vạch trên trắc vi thị kính.

– Nếu gọi B là số vạch của trắc vi thị kính trùng với số vạch trên trắc vi vật kính.

– Nếu gọi C là kích thước của vật thể tính theo số vạch trên trắc vi thị kính.

– Nếu gọi D là kích thước thật của vật thể nghiên cứu tính bằng micromet.

Ta có công thức

$$D = \frac{10 \cdot AC}{B} (\mu\text{m})$$

(10 là kích thước mỗi vạch của trắc vi vật kính tính bằng micromet).

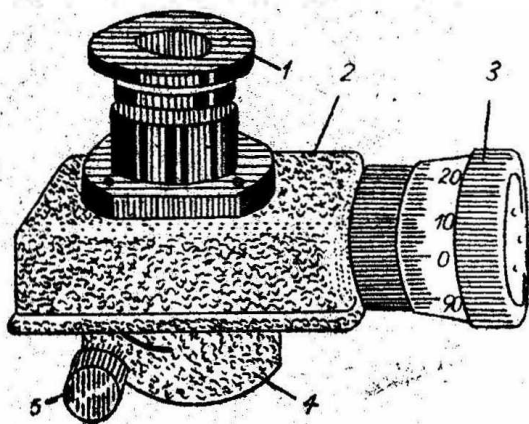
Vi dụ: giả sử khi đo đường kính của hạt phấn ngô trên kính hiển vi ta quan sát thấy 100 vạch của trắc vi vật kính trùng với 80 vạch của trắc vi thị kính. Đường kính của hạt phấn ngô ứng với 8 vạch trên trắc vi thị kính. Như vậy ở đây $A = 100$; $B = 80$; $C = 8$. Thay các giá trị vào công thức trên ta có đường kính của hạt phấn ngô:

$$D = \frac{10 \cdot 100 \cdot 8}{80} = 200 \mu\text{m}$$

Cần chú ý giá trị của trắc vi thị kính được tính cho vật kính phóng đại nhỏ không thích hợp khi làm việc ở độ phóng đại lớn. Vì vậy trước khi bắt đầu đo nhất thiết phải xác định giá trị vạch đo cho tất cả các vật kính.

Trong những trường hợp cần định hướng tiêu bản để đo vật thể ở các hướng khác nhau phải dùng thị kính có vạch lưới ô vuông.

Để đo vật thể có độ chính xác lớn nhất thì dùng trắc vi thị kính ô xoay MOB-15 (hình 2) là loại có thị kính với độ phóng đại $15 \times$, có đế với vòng đai lắp lên ống nối của kính hiển vi, có ốc xoay đo vi lượng và trống xoay.



Hình 2 – Trắc vi thị kính ô xoay MOB-1-15 và thước đo. 1. thị kính; 2. vỏ ô; 3. trống xoay; 4. đế; 5. ốc đai;

Trên mặt thị kính có thang bất động gồm 8 vạch chia, mỗi vạch 1mm, một chữ thập di động và kim chỉ ở vạch đôi. Đọc số trên thang (milimét) và trên trống (phần trăm milimet).

Trước khi đo vật thể phải xác định độ phóng đại của vật kính hiển vi bằng cách đặt trắc vi vật kính lên bàn kính và để trắc vi thị kính ô xoay trên trống nối rồi lấy tiêu điểm cho độ nét của hình ảnh của chữ thập và thang của trắc vi vật kính. Để vạch đôi ở

điểm bắt đầu hoặc điểm cuối của thước chia. Lấy một số nào đó trên thước chia của trắc vi vật kính, ví dụ 25: chuyển chữ thập đến vạch đầu của thang và ghi lại số, rồi chuyển chữ thập đến vạch 25 của vật kính và ghi lại số đó.

Độ phóng đại theo tuyến của vật kính được xác định bằng công thức:

$$V = \frac{II - I}{ab}$$

Trong đó V là độ phóng đại của vật kính. Đây là hệ số đo thực của vật kính tính theo số vạch trên trắc vi thị kính.

II - I sai số của hai lần đọc

- a. Số vạch trên trắc vi vật kính.
- b. giá trị một vạch của trắc vi vật kính.

Để đo kích thước của vật thể ta đề tiêu bản lên bàn kính hiển vi, đề tâm chữ thập khớp với mép của hình ảnh vật thể và ghi số. Sau đó dịch chuyển chữ thập đến khớp với mép bên kia của vật thể và ghi lại số. Kích thước của vật thể được xác định theo công thức:

$$D = \frac{II - I}{V}$$

Trong đó D là kích thước của vật thể tính theo mm.

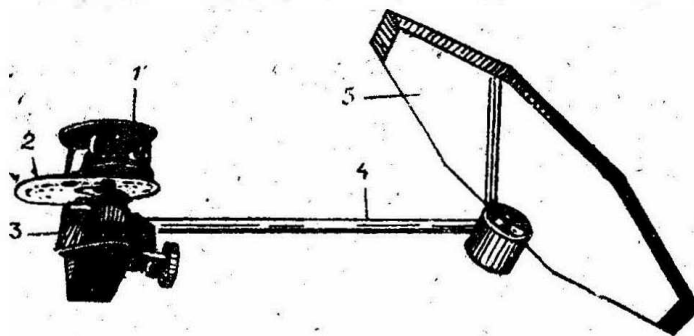
V độ phóng đại của vật kính

II - I sai số giữa hai lần đọc.

7.2. Sử dụng gương vẽ trên kính hiển vi.

Khi tiến hành các nghiên cứu di truyền như đếm số lượng nhiễm sắc thể, nghiên cứu kiểu nhân, sự phát sinh giao tử, sự phát sinh bào tử, v.v... đề ghi nhận chính xác các quan sát người ta thường dùng phương pháp chụp ảnh hoặc vẽ lại tiêu bản nhờ sử dụng gương vẽ của Liên Xô PA - 2; PA - 4; PA - 5; PA - 6. Tất cả gương vẽ đều có cấu tạo hơi giống nhau: có một lăng kính khối Apbe đề trong khung kim loại gấp được, kính phản chiếu gắn đầu cần, hai kính lọc sáng màu gio thay thế nhau (một cái nằm trên cánh xoay, một cái nữa nằm trên trống xoay) và một vòng đai. Sau đây xin nêu một số công việc cần lưu ý khi làm việc với các loại gương vẽ khác nhau trên kính hiển vi.

+ Gương vẽ PA - 4 (hình 3)



Hình 3 - Gương vẽ PA - 4.

1. Hộp khung gấp được có lăng kính khối;
2. Cánh xoay với các kính lọc sáng;
3. Vòng đai;
4. Cần;
5. Kính phản chiếu.

Đối với gương vẽ này khi sử dụng theo đúng thứ tự các công việc sau :

— Điều chỉnh ánh sáng và lấy tiêu điểm cho tiêu bản.

— Lấy thị kính ra khỏi ống nối, dùng vòng đai để lắp gương vẽ, để lại thị kính vào vị trí cũ. Để sát hộp khung gập của gương vẽ lên thị kính. Để kính phản chiếu thành một góc 45° với cần.

— Nếu kính hiển vi có ống nối đặt nghiêng để vẽ thì phải sử dụng bàn nghiêng và phải tính thế nào để mặt bàn vẽ thẳng góc với trục ống nối.

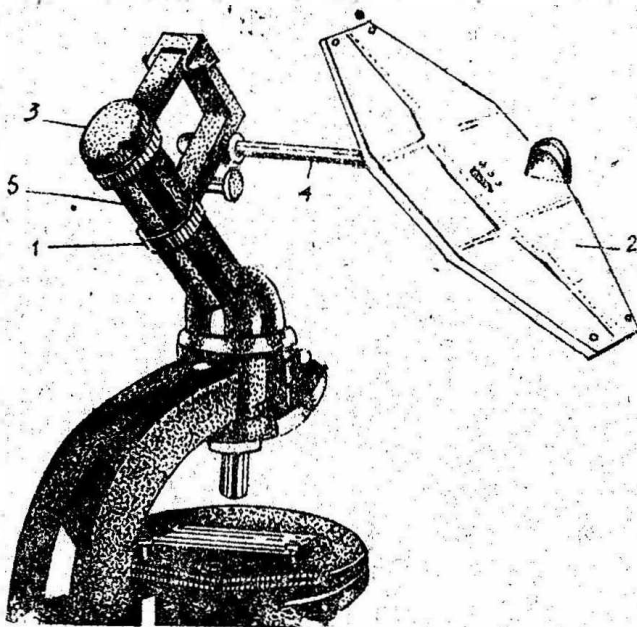
Khi ống nối thẳng đứng thì mặt giấy phải song song với mặt bàn.

— Để cùng một lúc đồng thời nhìn thấy hình ảnh của vật thể, tờ giấy vẽ và đầu bút chì thì phải tăng độ chiếu sáng ở đầu bút chì và hình ảnh của vật thể định vẽ. Muốn vậy người ta dùng biển trở của đèn chiếu và cái lọc sáng trên cánh tay xoay của gương vẽ để điều chỉnh. Bộ lọc sáng thứ 2 ở trên trống gương vẽ dùng để điều chỉnh độ sáng của hình ảnh ở đầu bút chì.

— Qua gương vẽ, dùng bút chì vẽ hình ảnh các chi tiết của vật thể lên giấy và bổ sung dần những chi tiết cần thiết của hình vẽ.

— Bằng trục vi vật kính (xem mục 7.1) xác định độ phóng đại ảnh của vật thể.

— Đối với các đối tượng phức tạp có thể dùng trục vi thị kính lưới. Bằng cách vẽ hình ảnh lưới lên giấy và trong mỗi ô vuông lại dùng bút chì vẽ chu vi các chi tiết nhất định của hình ảnh hiển vi. Khi vẽ xong hình lấy tiêu bản ra khỏi mâm kính và đặt trục vi vật kính vào để xác định độ phóng đại của hình vẽ.



Hình 4 — Gương vẽ PA — 5.

1. Vòng đai; 2. Kính phản chiếu; 3. Hộp khung gập che thị kính, có lăng kính khời; 4. Cần; 5. Thị kính $4\times$.

+ Dụng cụ vẽ PA — 5 (hình 4)

Gương vẽ PA—5 cho phép chiếu vật lên màn nằm ngang hay thẳng đứng. Khi vẽ bằng dụng cụ này, ta điều chỉnh kính hiển vi và định tiêu chuẩn cho mẫu, lắp kính đóng thị kính lại và ảnh hiện rõ trên tờ giấy. Khi vẽ bằng PA—5 có thể sử dụng bất kì vật kính nào, nhưng thị kính nhất thiết phải sử dụng loại $4\times$ của gương vẽ PA—5 vẽ trong buồng tối khi dùng ánh sáng nhân tạo chiếu sáng mẫu. Trật tự các bước tiến hành sử dụng PA—5 có thể tóm tắt như sau :

— Điều chỉnh kính hiển vi, định tiêu điểm cho vật thể với vật kính tương ứng và thị kính $4\times$ của bộ dụng cụ vẽ.

– Khoác vòng cô dụng vẽ lên ống kính hiển vi và vặn vít sao cho đầu gương vẽ PA – 4 được xếp trên mặt trên của khung thị kính.

– Xoay gương của gương vẽ chiếu chùm tia sáng đi ra khỏi thị kính của kính hiển vi lên tờ giấy trắng.

– Vặn vít nhỏ của kính hiển vi sao cho ảnh của vật thể hiện rõ trên giấy vẽ. Cần lưu ý là phòng đèn vẽ phải đủ tối, tờ giấy vẽ phải ehe kín chỉ để cho nguồn sáng hắt ảnh của vật thể lên đó.

– Vẽ chu vi ảnh của vật thể nghiên cứu, sau đó bỏ gương vẽ PA–5 ra rồi nhìn vào thị kính đối chiếu ảnh với hình vẽ và hoàn chỉnh lại các chi tiết của hình.

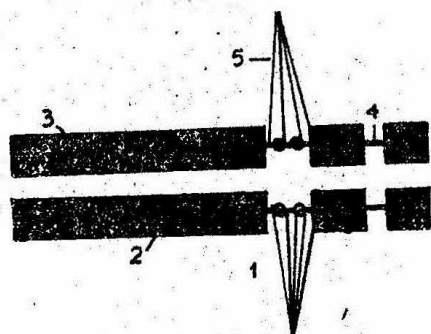
– Xác định độ phóng đại của vật thể nghiên cứu bằng thước vi vật kính.

II – KIỂU NHÂN VÀ HÌNH THÁI NHIỄM SẮC THỂ

Thường người ta nghiên cứu nhiễm sắc thể ở kì giữa của phân bào gián phân. Ở kì này nhiễm sắc thể ở trạng thái xoắn cực đại và có dạng to, mập. Trong giai đoạn này mỗi nhiễm sắc thể gồm một cặp đơn nhiễm sắc thể xếp song song gắn với nhau bằng tâm động.

Kiểu nhân là toàn bộ bộ nhiễm sắc thể của cơ thể tức là bộ lưỡng bội của nó được xác định bởi độ lớn, hình dạng, và số lượng nhiễm sắc thể. Số lượng nhiễm sắc thể là dấu hiệu thứ nhất xác định tính đặc hiệu của kiểu nhân, ví dụ ở củ cải là 18, ở đậu Hà Lan là 14, ở chó 78, ở người là 46,...

Trong bộ nhiễm sắc thể lưỡng bội của tế bào xô ma ($2n$) lại có những thể nhiễm sắc tương đồng có hình thái giống nhau nhưng thuộc các genom khác nhau của bố và mẹ. Nhờ vậy có thể tách toàn bộ bộ nhiễm sắc thể lưỡng bội thành một số cặp nhiễm sắc thể tương đồng nhất định. Ngoài ra trong nhiều trường hợp còn thấy cá thể đực và cái của cùng 1 loài cũng khác nhau về nhiễm sắc thể giới tính.



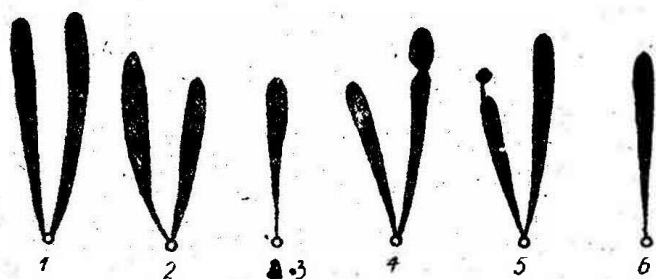
Hình 5 – Sơ đồ cấu tạo nhiễm sắc thể ở kì giữa (theo A.A. Prokofeeva Bengovxkaia 1966)

1. eo sơ cấp với tâm động; 2. vai dài; 3. nhiễm sắc thể đơn (chromatid); 4. eo thứ cấp; 5. sợi tơ vô sắc.

Cùng với số lượng nhiễm sắc thể thì hình thái của chúng cũng có ý nghĩa to lớn khi mô tả kiểu nhân. Nói đến hình thái nhiễm sắc thể người ta thường lưu tâm đến các đặc điểm về chiều dài vai, vị trí của tâm động, sự có mặt của eo thứ cấp, và thể kèm (satellite) (hình 5). Nhiễm sắc thể có thể có một hoặc 2 thể kèm. Thể kèm của nhiễm sắc thể khác nhau thì khác nhau về hình dạng, kích thước và chiều dài của sợi liên kết với thân chính. Ở nhiễm sắc thể này thì eo thứ cấp có thể có vai dài, còn ở nhiễm sắc thể khác lại có vai ngắn.

Phần cuối của nhiễm sắc thể gọi là đầu mút (telomere). Những phần này không có khả năng liên kết với các phần khác của

nhiễm sắc thể. Chiều dài bình thường của mỗi nhiễm sắc thể và chiều dài tổng số tất cả các nhiễm sắc thể của kiểu nhân là ổn định. Hình thái của nhiễm sắc



Hình 6 - Các dạng nhiễm sắc thể khác nhau.
1. Nhiễm sắc thể tâm cân; 2. Nhiễm sắc thể tâm lệch; 3. Nhiễm sắc thể tâm mút; 4. Nhiễm sắc thể có eo thứ cấp; 5. Nhiễm sắc thể có thể kèm; 6. Nhiễm sắc thể tâm đầu.

thể được xác định trước hết bởi vị trí của tâm động. Các nhiễm sắc thể tâm cân (metacentric M) có đặc điểm là tâm động nằm chính giữa và chiều dài hai vai bằng nhau hoặc gần bằng nhau. Các nhiễm sắc thể tâm lệch (submetacentric - S) có tâm động nằm dịch về một phía và chiều dài vai khác nhau. Nhiễm sắc thể tâm mút (acrocentric - A) thì tâm động nằm gần đầu mút, còn nhiễm sắc thể tâm đầu (telocentric - T)

có tâm động nằm ngay trên một đầu của nhiễm sắc thể và chỉ có một vai (hình 6)

Để xác định mức độ không đều của các vai người ta tính tỉ lệ chiều dài vai dài so với chiều dài vai ngắn thông qua chỉ số vai (I^b) theo phương pháp tính A.A Prokofeeva, Bengovskaia, V.M Gindilis (1965)

$$I^b = \frac{\text{chiều dài vai dài}}{\text{chiều dài vai ngắn}}$$

Từ đó có thể chia các nhiễm sắc thể thành các nhóm. Nếu tỉ lệ chiều dài vai bằng 1-1,9 thì nhiễm sắc thể thuộc nhóm tâm cân. Nếu tỉ lệ bằng 2-4,9 thì thuộc nhóm tâm lệch. Còn khi tỉ lệ đo ≥ 5 thì nhiễm sắc thể thuộc nhóm tâm mút (I.X Nemxeva, 1970). Các nhiễm sắc thể có tỉ lệ chiều dài các vai hơn 8 mà hình dạng vai ngắn gần giống hình cầu thì gọi là nhiễm sắc thể tâm đầu.

Kiểu nhân của *crepis Capillaris* (L) wallr chia thành hai nhóm nhiễm sắc thể: nhiễm sắc thể thể dài và ngắn thuộc nhóm S. Nhiễm sắc thể có thể kèm thuộc nhóm A.

Ngoài ra để nghiên cứu các nhiễm sắc thể người ta còn sử dụng nhiều chỉ tiêu khác:

- Chiều dài tuyệt đối của mỗi nhiễm sắc thể tính bằng micromet (L^a).
- Chiều dài tương đối của nhiễm sắc thể (L^r) tính bằng phần nghìn hoặc phần trăm

$$L^r = \frac{\text{chiều dài của nhiễm sắc thể nghiên cứu}}{\text{chiều dài của tất cả các nhiễm sắc thể}} \cdot 100 \text{ (hoặc nhân với 1000)}$$

– Chỉ số tâm động I^c tính bằng %

$$I^c = \frac{\text{chiều dài vai ngắn của nhiễm sắc thể}}{\text{chiều dài cả nhiễm sắc thể}} \cdot 100$$

– Chỉ số xoắn (I^s)

$$I^s = \frac{\text{tổng chiều dài của 2 thể nhiễm sắc xoắn}}{\text{tổng chiều dài của 2 thể nhiễm sắc dài}} \cdot 100$$

Cần lưu ý rằng những kết luận cuối cùng về kích thước và cấu trúc của các nhiễm sắc thể phải dựa trên những dẫn liệu phân tích hơn 40 tế bào đang phân chia ở kì giữa trong 10 tiêu bản khác nhau sau khi đã xử lí thống kê.

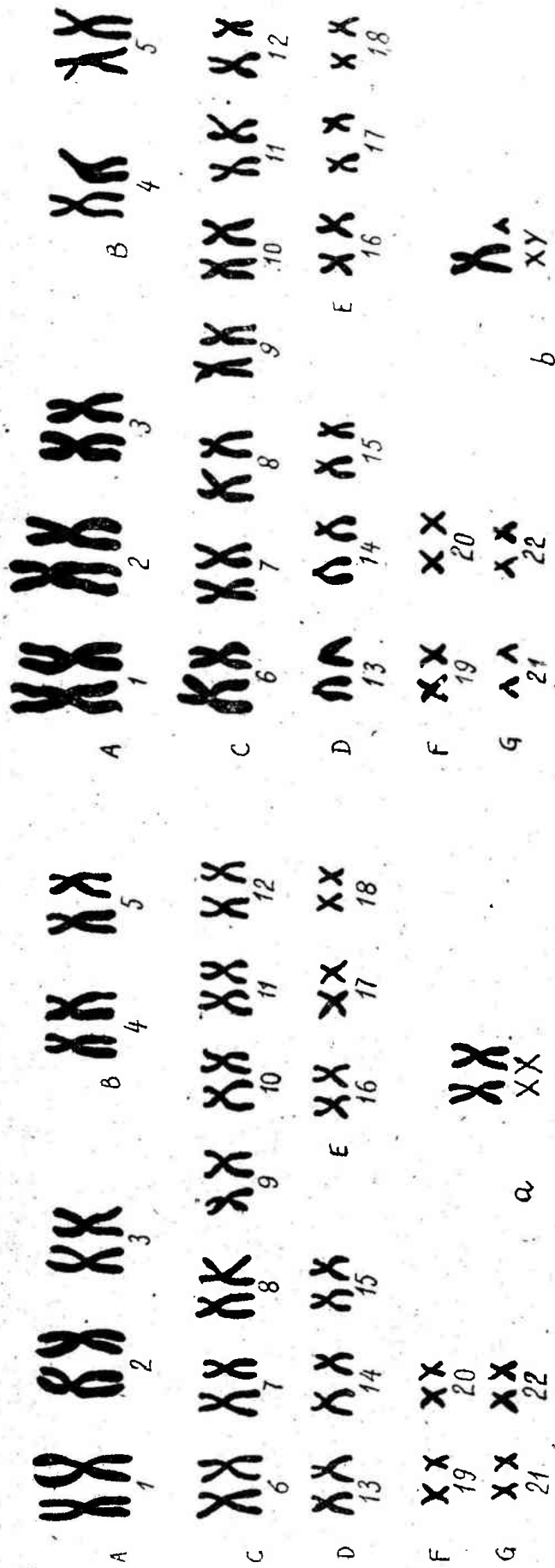
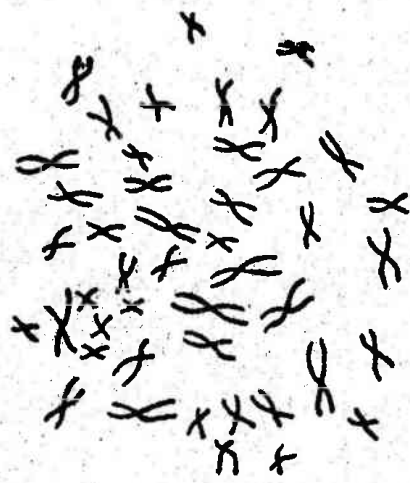
Theo tài liệu của một số tác giả (G.A Lenixki, M.A Xizova, 1935) thì trên tiêu bản cắt lát hiển vi của *crepis capillaris* nhiễm sắc thể A có chiều dài $7,6 \mu\text{m}$, nhiễm sắc thể D là $6,2 \mu\text{m}$ và nhiễm sắc thể C là $4,3 \mu\text{m}$. Do trên các tiêu bản cắt lát hiển vi khó nghiên cứu chỗ eo của nhiễm sắc thể vì vậy người ta phải sử dụng tiêu bản ép đê bồ sung bằng cách xử lí sơ bộ consixin chò rẽ trước khi cố định. Lúc đầu quan sát tiêu bản ở độ phóng đại nhỏ để tìm kì giữa, sau đó chuyển sang độ phóng đại lớn với vật kính $40 \times$ hoặc $45 \times$ hay cao hơn. Muốn quan sát chỗ eo rõ người ta sử dụng vật kính chìm.

Nếu sắp xếp tất cả nhiễm sắc thể của một kiểu nhân dưới dạng biểu đồ theo thứ tự từ lớn đến nhỏ ta sẽ có biểu đồ nhiễm sắc thể (idiogram).

Muốn thiết lập được idiogram ta vẽ lại bộ nhiễm sắc thể trên kính hiển vi qua gương vẽ hoặc qua ảnh chụp. Sau đó cắt rời ra ghép theo thứ tự độ lớn của chúng. Ví dụ biểu đồ nhiễm sắc thể của người $2n = 46$. Trên biểu đồ bộ nhiễm sắc thể ở đàn ông và đàn bà chỉ khác nhau về các nhiễm sắc thể giới tính (hình 7).

Tế bào cơ thể đàn ông mang nhiễm sắc thể giới tính XY và đàn bà mang nhiễm sắc thể giới tính XX. Các đôi nhiễm sắc thể thường được kí hiệu bằng chữ A (autosome) của đàn bà và đàn ông đều giống nhau. Nhiễm sắc thể là vật mang gen, vì vậy việc nghiên cứu chúng có một ý nghĩa rất lớn. Việc nghiên cứu hình thái và đếm số lượng nhiễm sắc thể, thiết lập idiogram của các kiểu nhân trong phòng thí nghiệm với thời gian ngắn có thể sử dụng các đối tượng thực vật có bộ nhiễm sắc thể ít, hình thái nhiễm sắc thể dễ phân biệt lẫn nhau. Thường người ta sử dụng các đối tượng: *crepis capillaris* ($2n = 6$), *Crepis tectorum* ($2n = 8$) *Arabidopsis* ($2n = 6$ hoặc bằng 10), *Allium cepa* ($2n = 10$) Đậu Hà lan ($2n = 14$), dưa chuột ($2n = 14$).

Trên đối tượng động vật thường sử dụng một số đối tượng sau: người ($2n = 46$), bò ($2n = 60$), ngựa ($2n = 66$), Ruồi dấm ($2n = 8$), v.v... Số lượng nhiễm sắc thể trong tế bào cơ thể của 1 số loài thực vật và động vật đã biết rõ.



Hình 7 - Kiểu nhân của người.

a) ở đàn bà; b) ở đàn ông; (theo tài liệu của bệnh viện Bạch Mai Hà Nội)

Bảng 1

Số lượng nhiễm sắc thể ở một số loài động vật và thực vật

Loài	Số lượng nhiễm sắc thể trong tế bào	
	Sinh dục (n)	xôma (2n)
+ Ở động vật :		
Người (<i>Homo Sapiens</i>)	23	46
Bò (<i>Bos taurus</i>)	30	60
Ngựa (<i>Equus caballus</i>)	33	66
Chó (<i>Canis Familiaris</i>)	39	78
Chuột nhà (<i>Mus musculus</i>)	20	40
Thỏ (<i>Oryctolagus aeneus</i>)	22	44
Ếch (<i>Rana esculenta</i>)	13	26
Ruồi dấm (<i>D. Melanogaster</i>)	4	8
+ Ở thực vật :		
Ngô (<i>Zea mays</i> L.)	10	20
Lúa mì cứng (<i>Triticum vulgare</i> L.)	21	42
Kê thông thường (<i>Panicum miliaceum</i> L.)	18	36
Lúa (<i>Oryza sativa</i> L.)	12	24
Đậu Hà Lan (<i>Pisum sativum</i> L.)	7	14
Đậu tây (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	11	22
Đậu tương (<i>Glycine hispida</i> L.)	19	38
Lạc (<i>Arachis hypogaea</i> L.)	20	40
Vừng (<i>Sesamum indicum</i> L.)	13	26
Bông cổ (<i>Gossypium herbaceum</i> L.)	13	26
Khoai tây (<i>Solanum tuberosum</i> L.)	24	48
Thuốc lá (<i>Nicotiana glauca</i> L.)	24	48
Cà chua (<i>Lycopersicon esculentum</i> L.)	12	24
Ớt đỏ (<i>Capsicum annuum</i> L.)	12	24
Dưa chuột (<i>Cucumis sativus</i> L.)	7	14
Dưa hấu (<i>Citrullus vulgaris</i> L.)	11	22
Hành tây (<i>Allium cepa</i> L.)	8	16
Cải bắp (<i>Brassica oleracea</i> var. <i>capitata</i> L.)	9	18
Mơ (<i>Anemone vulgaris</i> L.)	8	16
Mận (<i>Prunus domestica</i> L.)	24	48
Đào (<i>Persica vulgaris</i> L.)	8	16

I. Phương pháp nghiên cứu hình thái và đếm số lượng nhiễm sắc thể trên tiêu bản tạm thời.

1.1. Ở thực vật.

a) Mục đích yêu cầu:

– Nắm được phương pháp làm tiêu bản tạm thời trên bao phấn non, trên chóp rễ, trên các lá non, v.v...

– Quan sát, vẽ và thiết lập được idiôgram của các đối tượng nghiên cứu.

– Phân loại được các kiểu nhiễm sắc thể khác nhau trên từng đối tượng nghiên cứu qua các chỉ tiêu nhận dạng nhiễm sắc thể.

b) Vật liệu và thiết bị. Chuẩn bị cho sinh viên các vật liệu và thiết bị sau :

– Các bao phấn non, rễ non, lá non của hành tây, dưa chuột, đậu Hà lan đã được cố định (carnoy và giữ trong cồn 70% – 80% (xem mục 6).

– Gương vẽ và mạng lưới thị kính.

– Kính hiển vi có độ phóng đại lớn 600 – 1350 lần.

– Lưỡi dao bào, giấy thấm, kim phân tích, đèn cồn, lam và lamén sạch.

– Hóa chất: axeto cacmin 3% (hoặc lacmoit), axit axetic 45%.

c) Các bước tiến hành:

+ *Trên bao phấn non của hành tây:*

– Dùng kim phân tích tách 2–3 bao phấn ở các vị trí khác nhau của hoa tự. Loại bỏ các cơ quan phụ của hoa giữ lại các bao phấn trên lam kính.

– Giâm nát các bao phấn bằng kim phân tích. Nhỏ 1 – 2 giọt axeto cacmin 3% (hoặc lacmoit) rồi tiếp tục giâm nát. Đun sôi nhỏ lửa trên ngọn đèn cồn vài lần. Thời gian nhuộm 7 – 10 phút.

– Dùng giấy thấm hút hết axeto cacmin còn thừa, nhỏ một giọt axit axetic 45% hoặc glixerin rồi đặt lamén (chú ý tránh bọt khí), đặt một tờ giấy thấm lên lam kính, dùng đầu que diêm không thuốc gỗ nhẹ dè dàn mỏng tế bào trên tiêu bản thành một lớp. Mỗi sinh viên cần chuẩn bị 10 tiêu bản có các đĩa kì giữa.

– Lần lượt quan sát các tiêu bản đã chuẩn bị trên kính hiển vi có độ phóng đại từ 600–1350 lần. Phát hiện các tiêu bản có các đĩa kì giữa rõ.

– Sử dụng gương vẽ trên kính hiển vi, dùng bút chì vẽ lại chi tiết bộ nhiễm sắc thể quan sát được ở các tế bào (xem mục 7-2).

– Qua trục vi vật kính và trục vi thị kính xác định mức độ phóng đại của bộ nhiễm sắc thể (xem mục 7.1).

– Đo kích thước của mỗi nhiễm sắc thể đơn ở giai đoạn kì giữa 2 để nhận dạng nhiễm sắc thể về chiều dài tương đối, chỉ số vai, chỉ số tâm động. Qua đó phân loại các kiểu nhiễm sắc thể, và cho biết số lượng bộ đơn bội nhiễm sắc thể.

– Cắt rời các nhiễm sắc thể, dán các nhiễm sắc thể vào vở tường trình từ lớn đến bé và ghi nhận xét.

+ *Trên rễ đậu Hà lan, dưa chuột, hành tây.* Được tiến hành qua mấy bước sau :

– *Chuẩn bị và cố định mẫu:* Gieo các loại hạt trên vào cát ẩm sau khi rễ dài từ 1 – 1,5cm cắt lấy phần rễ, rửa sạch bằng nước lạnh và cố định chúng trong dung dịch carnoy. Đối với hạt hành tây thì có thể cố định luôn cả hạt

và rễ. Thời gian cố định 3h. Cố định xong chuyển giữ chúng trong cồn 70% hoặc 80% (xem thêm mục 6)

— *Nhuộm mẫu vật*: Cắt lấy 1 chóp rễ non đã cố định của mỗi loài cây trên (phần mô phân sinh) đặt lên lam kính sạch, nhỏ 1 giọt axeto cacmin 3%, hơ nhẹ lửa trên ngọn đèn cồn vài lần. Thời gian nhuộm 7—10 phút. Dùng giấy thấm hút hết cacmin axeton còn thừa sau đó nhỏ 1 giọt axit axetic 45%, đẩy lam lên dàn mẫu vật thật mỏng như trên.

— *Thu nhận kết quả*: Mỗi sinh viên chuẩn bị xong một số tiêu bản, sau đó lần lượt đưa các tiêu bản quan sát trên kính hiển vi với độ phóng đại lớn phát hiện các đĩa kì giữa tốt. Sử dụng gương vẽ, trắc vi vật kính, trắc vi thị kính tiến hành vẽ, đo, đếm số lượng nhiễm sắc thể của từng loài cây nghiên cứu, thiết lập các idiogram và dán các nhãn đồ vào vở tương trình rồi ghi nhận xét. (Hình 8, 9).

+ *Trên lá non củ cải, đậu, cà chua*:

— Cố định các lá non củ cải, đậu, cà chua, v.v... (lúc rễ có độ dài 3—7mm) trong dung dịch carnoy 1h30'—4h.

— Chuyển các lá non đã cố định vào hỗn hợp HCl đậm đặc và cồn metilic theo tỉ lệ 1:1, giữ chúng trong hỗn hợp đó 5 phút.

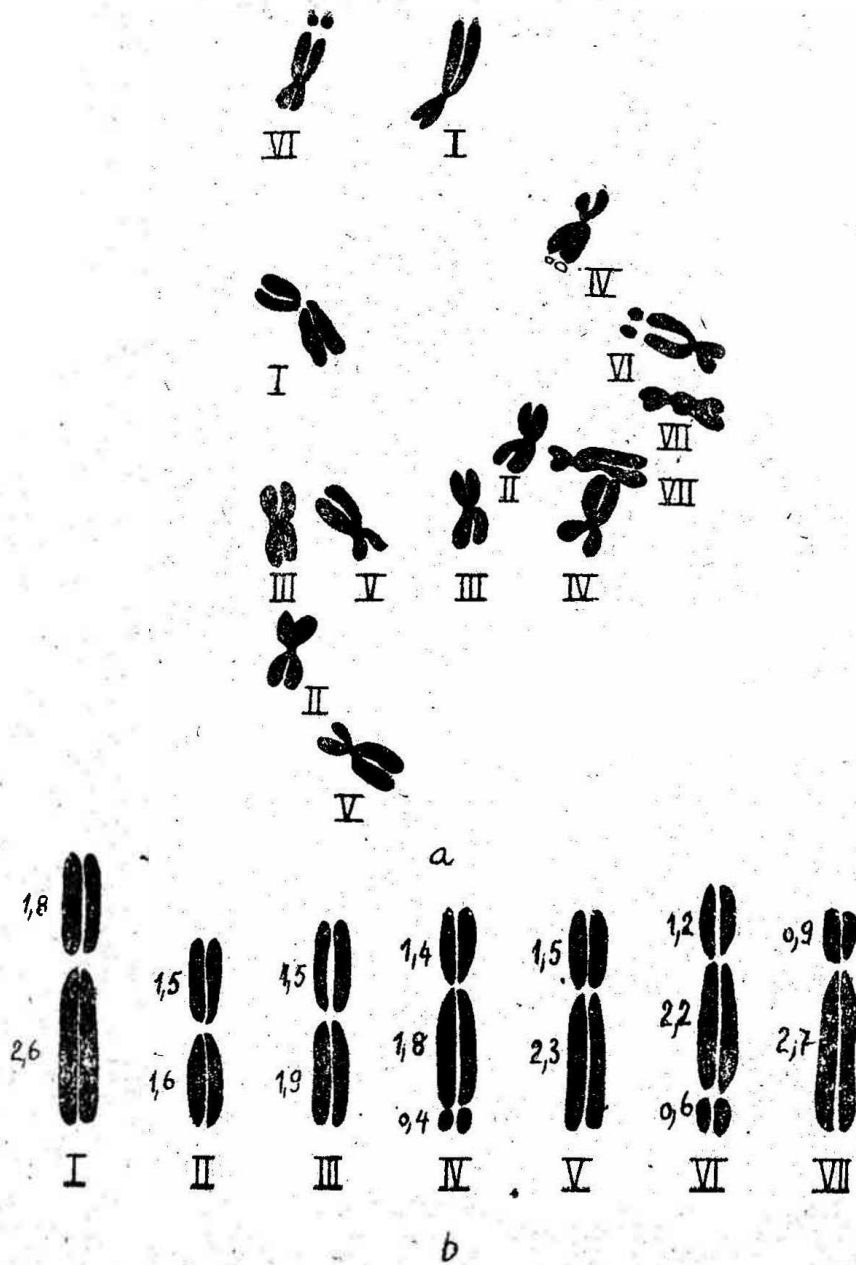
— Dùng pince con chuyển 1 lá non lên lam kính, giở 1 giọt axeto cacmin 3% lên lá non, hơ nhẹ vài lần trên ngọn lửa đèn cồn.

— Đẩy la men, dùng giấy hút hết axeto cacmin thừa. Giở vào 1 góc lam 1 giọt axit axetic 45%, dàn mỏng tiêu bản bằng đầu que diêm không thuốc

— Đưa các tiêu bản quan sát dưới kính hiển vi có độ phóng đại lớn. Phát hiện các đĩa kì giữa, rồi tiến hành xác định các chỉ tiêu như phần thu nhận kết quả trên rễ đậu Hà lan, dưa chuột, hành tây.



Hình 8 - Kiểu nhân ở chóp rễ hành tây (*Allium cepa*)



Hình 9 - Các nhiễm sắc thể và biểu đồ các thể nhiễm sắc của đay Hà lan. (theo Blixt, 1958).

a) Các nhiễm sắc thể; b) Biểu đồ các nhiễm sắc thể của kiểu nhân bình thường.

1.2. Ở động vật.

a) Mục đích yêu cầu:

- Nắm được phương pháp làm tiêu bản tạm thời để nghiên cứu hình thái và đếm số lượng nhiễm sắc thể.

- Phân biệt các kiểu nhiễm sắc thể khác nhau trên từng đối tượng nghiên cứu, vẽ và thiết lập idiogram.

b) Vật liệu thiết bị:

- Châu chấu đồng (acrideze); thỏ đực, ruồi dấm.

- Bộ đồ mổ côn trùng.
- Kim phân tích, kim mũi mác.
- Đĩa đồng hồ.
- Giấy thấm, giá để tiêu bản.
- Kính hiển vi, lam, lamén sạch, cốc thủy tinh.
- Gương vẽ, trắc vi thị kính, trắc vi vật kính.
- Giấy trắng.
- Dung dịch cố định carnoy
- Dung dịch nhuộm tương natri xitrat 1%
- Axeto cacmin 5%.

c) Các bước tiến hành:

+ Ở châu chấu đồng:

- *Mổ châu chấu và tách tinh hoàn*: lấy một con châu chấu đực, dùng kéo cắt hết cánh. Tay trái cầm châu chấu, tay phải dùng kéo cắt bỏ phần đuôi (vài đốt cuối bụng). Dùng kéo cắt một đường phía bụng dọc theo trục cơ thể từ đuôi đến ngực. Dùng kim mũi mác kéo các nội quan ra khỏi cơ thể và tách riêng lấy tinh hoàn (có dạng hình chùm sợi và có các thê mỡ vàng bao quanh)

- *Nhuộm tương tế bào*: nhỏ 3 giọt dung dịch natri xitrat 1% (có thể dùng natri clorua) lên lam kính sạch, lấy 3 - 4 ống sinh tinh sạch đặt lên dung dịch. Sử dụng kim phân tích xé rách bào sơ của ống sinh tinh để phân tán các tế bào. Thời gian xử lí nhuộm tương 5 phút.

- *Nhuộm tiêu bản*: đưa các tế bào đã nhuộm tương lên lam kính sạch. Giỏ 1 giọt axeto cacmin 5% (hoặc axeto ocsein) lên mẫu vật. Nhuộm 5 - 10 phút. Lúc nhuộm nhớ úp đĩa đồng hồ lên trên để thuốc nhuộm đỡ bay hơi.

- *Làm tiêu bản*: đặt lamén lên lam kính rồi phủ 1 tờ giấy thấm lên trên, lấy ngón tay cái ấn mạnh cho thấm hết thuốc nhuộm thừa và dần mỏng các tế bào, làm vỡ màng nhân để nhuộm sắc thê tung ra.

- *Đọc kết quả*: đặt các tiêu bản đã làm lên kính hiển vi có độ phóng đại lớn. Tìm các đĩa kì giữa có các nhiễm sắc thê dàn đều, để quan sát. Sử dụng gương vẽ hay mạng lưới thị kính vẽ các đường viền, các chi tiết cần thiết của nhiễm sắc thê lên giấy.

Thiết lập idiogram, phân biệt các dạng nhiễm sắc thê qua các chỉ tiêu cần thiết. Đếm số lượng nhiễm sắc thê và dán kiểu nhân và nhân đồ vào vở tường trình.

+ Ở ống sinh tinh chó.

Mổ lấy tinh hoàn của chó đực, lau sạch các tia máu, cố định tinh hoàn 3h trong dung dịch cố định carnoy.

- Lấy một ống sinh tinh đặt lên lam kính, dùng kim mũi mác tách bỏ các bào sơ của ống sinh tinh.

- Nhuộm bằng 1 giọt axeto cacmin 5% trong 10 phút.

- Đặt lamén và dùng ngón tay cái ấn nhẹ để tế bào trải đều thành một lớp mỏng, phá vỡ màng nhân cho nhuộm sắc thê tung ra.

— Đưa tiêu bản lên kính hiển vi có độ phóng đại lớn. Phát hiện các đĩa ki giữa rõ nhất, các nhiễm sắc thể không chồng lên nhau,

— Dùng gương vẽ viền các nhiễm sắc thể lên giấy. Thiết lập idiogram, phát hiện các dạng nhiễm sắc thể và đếm số lượng nhiễm sắc thể và thực hiện đầy đủ các yêu cầu tương trình vào vở.

— Ở hạch thần kinh ruồi dấm (*D. Melanogaster*):

— Dùng kim phân tích mổ lấy hạch thần kinh ruồi dấm trên kính lúp meofa, cần xác định kĩ vị trí hạch thần kinh trước khi mổ (hình 10):

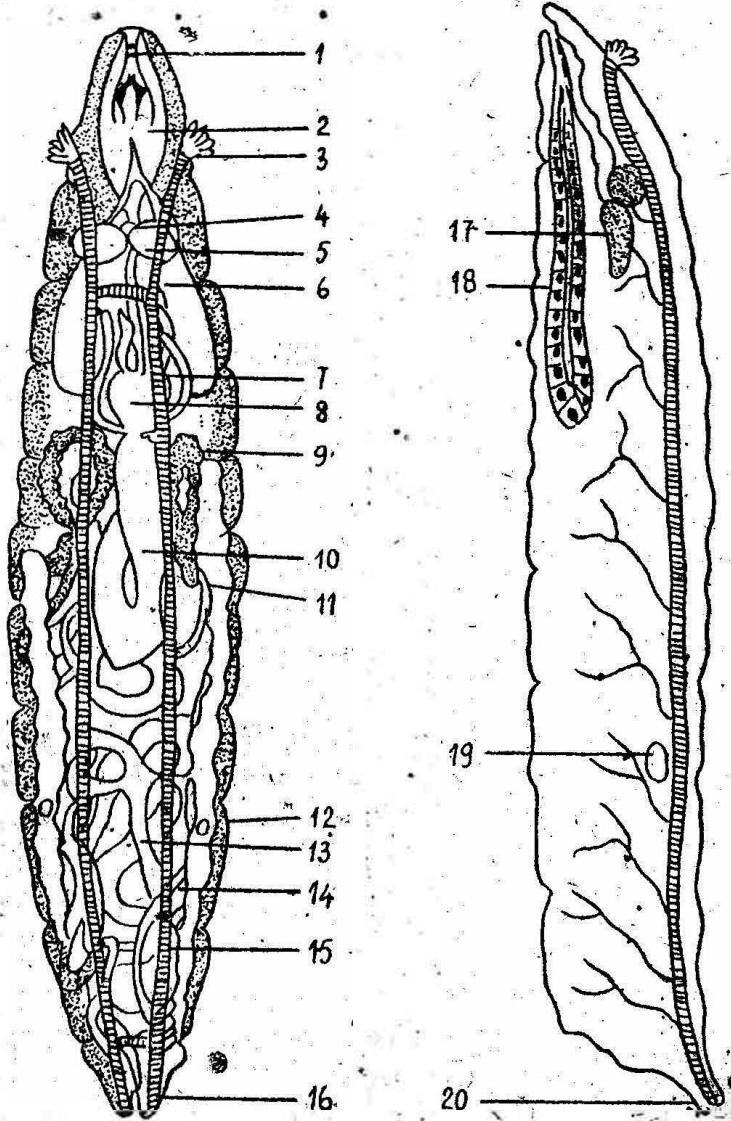
— Tách lấy hạch thần kinh ruồi dấm ngâm vào dung dịch natri xitrat 1% (1gam natri xitrat pha trong 100 ml nước cất) khoảng 20 phút: Sau đó chuyển hạch thần kinh vào axit axetic 50%, khoảng 15 phút.

— Nhuộm hạch thần kinh đã nhuộm trương bằng axeto cacmin 3–5% khoảng 2–3 phút.

— Đậy lamen, đặt lên lam kính một tờ giấy thấm hút thuốc nhuộm thừa dùng ngón tay trở ấn nhẹ để dàn mỏng các tế bào thành một lớp, màng nhân vỡ nhiễm sắc thể tung ra.

— Đọc tiêu bản trên kính hiển vi với độ phóng đại lớn.

— Sử dụng gương vẽ để thiết lập idiogram, đếm số lượng nhiễm sắc thể trên các đĩa metaphase (hình 11).



Hình 10 — Sơ đồ sắp xếp các cơ quan của ấu trùng ruồi dấm (*D. Melanogaster*).

1. Móc miệng; 2. Hậu; 3. Lỗ thở trước; 4. Tuyến vng;
5. Hạch thần kinh; 6. Thực quản; 7. Thùy dạ dày; 8. Dạ dày trước; 9. Ống Manpighi trước;
10. Ruột giữa; 11. Thờ mỡ; 12. Buồng trứng; 13. Ruột sau;
14. Khí quản; 15. Ống Manpighi sau; 16. Hậu môn;
17. Hạch bụng; 18. Tuyến nước bọt; 19. Tinh hoàn; 20. Lỗ thở sau.

Cần lưu ý muốn thu được nhiều đĩa ki giữa trước khi mổ dòi lấy hạch thần kinh, ta thêm vào môi trường nuôi ruồi dấm 1 ít consixin có nồng độ 0,04% khoảng 2h.



3

Hình 11 - Bộ nhiễm sắc thể lưỡng bội của ruồi dấm (*D. Melanogaster*),
1. ở ruồi dấm đực; 2. ở ruồi dấm cái; 3. ảnh chụp hiển vi bộ nhiễm sắc thể ruồi dấm cái

2. Phương pháp làm tiêu bản cố định nghiên cứu hình thái và đếm số lượng nhiễm sắc thể.

2.1. Ở thực vật.

* Trên chóp rễ hành tây,

a) Mục đích yêu cầu:

- Nắm được phương pháp làm và chuyển tiêu bản tạm thời thành tiêu bản cố định để sử dụng lâu dài cho công tác nghiên cứu.

- Vẽ, thiết lập idiogram, đếm và xác định hình thái nhiễm sắc thể.

b) Vật liệu và thiết bị:

- Rễ hành đã cố định trong dung dịch carnoy và giữ trong cồn 80% để ở điều kiện lạnh (4°C).

- Kính hiển vi có độ phóng đại lớn.

- Lam kính, lamén sạch.

- Giấy thấm, kim phân tích, kim mũi mác.

- Lưỡi dao bào, lọ đựng mẫu, kéo cắt giấy.

- Bút chì, đèn cồn.

- Giấy trắng, gương vẽ PA-4 hoặc PA-5.

- Trắc vi vật kính và trắc vi thị kính.

- Axeto cacmin 3%

- Axit axelic 45% (hoặc glixerin).

a) Các bước tiến hành.

— Sử dụng các chóp rẽ hành đã cố định trong dung dịch carnoy làm tiêu bản tạm thời, phát hiện và giữ lại những tiêu bản có nhiều đĩa ki giữa đạt tiêu chuẩn.

- Chuyển các tiêu bản tạm thời sang tiêu bản cố định.
- Đọc tiêu bản trên thị trường kính hiển vi, xác định các đĩa ki giữa rõ.
- Qua gương vẽ PA-4 hoặc PA-5 viền các nhiễm sắc thể lên giấy, rồi kiểm tra lại thật cẩn thận các chi tiết cần lưu ý về hình thái các nhiễm sắc thể.
- Thiết lập idiogram và đếm số lượng nhiễm sắc thể.
- Sử dụng trắc vi vật kính, trắc vi thị kính xác định độ phóng đại của nhiễm sắc thể.
- Xác định các chỉ tiêu về chỉ số vai, chỉ số điểm tâm, chỉ số xoắn, chiều dài tương đối của nhiễm sắc thể (hình 10).

Cần chú ý rằng trên các đối tượng khác như đậu Hà lan, đậu tương, thuốc lá, v.v... cũng tiến hành tương tự.

2.2. Ở động vật.

Trên đối tượng động vật việc nghiên cứu hình thái và đếm số lượng nhiễm sắc thể thường sử dụng các tiêu bản kì giữa của phân bào gián phân bởi vì ở kì này nhiễm sắc thể có đặc trưng rõ về hình thái và dễ đếm số lượng nhiễm sắc thể.

Hiện nay người ta chia các phương pháp làm tiêu bản cố định nghiên cứu hình thái và đếm số lượng nhiễm sắc thể ở động vật ra hai nhóm chính:

- Nhóm phương pháp trực tiếp.
- Nhóm phương pháp gián tiếp.

Sau đây xin nêu một số phương pháp thông dụng trong 2 nhóm phương pháp trên.

* Phương pháp làm tiêu bản cố định nghiên cứu hình thái và đếm số lượng nhiễm sắc thể trực tiếp từ tủy xương thỏ (*orycto lagus*).

b) Mục đích và yêu cầu:

- Nắm được phương pháp làm tiêu bản cố định trực tiếp từ tủy xương thỏ.
- Quan sát, thiết lập được idiogram, phát hiện các kiểu nhiễm sắc thể, đếm được số lượng nhiễm sắc thể ngay trên tế bào quan sát.

c) Vật liệu và thiết bị:

- Thỏ sống,
- Pipet pastơ (có kèm quả bóp cao su)
- Li tâm điện
- Lam kính và lamén sạch
- Đèn cồn
- Tủ ấm
- Bơm tiêm (kèm dụng cụ thông kim)
- Dung dịch nhược trương KCl 0,7%.

- Cồn 30%.
- Dung dịch carnoy cải tiến (chỉ pha trước lúc thí nghiệm, và để trong tủ lạnh (4°C)).
- Dung dịch mẹ giemsa (pha trước một tháng để trong tủ lạnh).
- Dung dịch chống đông natrixitrat 3,8%

c) Phương pháp tiến hành:

** Lấy dịch tủy xương:*

Tiêm consixin 0,05% vào ổ bụng với liều lượng 1ml/10gam thể trọng (ở bò sát tiêm consixin vào dưới da). Sau 2-3h dùng một bơm tiêm khác hút 0,5-1ml dịch tủy xương sống hay xương đùi cho ngay vào ống nghiệm có chứa 8ml dung dịch chống đông natrixitrat 3,8%.

- Li tâm với vận tốc 1500-2000 vòng/phút trong 5 phút. Loại trừ nước mặt, giữ lại cặn lắng.

** Nhược trương dịch tủy xương:*

- Thêm KCl 0,7% vào cặn lắng tế bào dịch tủy xương với tỉ lệ: 1 phần dịch tủy xương: 7 phần KCl 0,7% (KCl đã hấp cách thủy trước ở 37°C) và trộn đều bằng pipet Pastơ để nhược trương tế bào trong 7-10 phút.

- Li tâm với vận tốc 1500-2000 vòng/phút trong 7 phút. Loại trừ nước mặt, giữ lại cặn lắng (khoảng 0,5ml).

** Cố định tế bào đã nhược trương:*

- Rót 8ml dung dịch cố định carnoy cải tiến theo thành ống nghiệm vào các tế bào dịch tủy đã nhược trương và trộn đều để cố định trong 1 giờ.

- Li tâm 5 phút với vận tốc 1500-2000 vòng/phút. Dùng pipet pastơ hút bỏ từ từ phần nước mặt, giữ lại khoảng 0,5ml cặn lắng. Nếu thấy cặn lắng còn nhiều mỡ và chưa sạch, ta có thể tiếp tục làm lại vài lần như trên.

- Làm tươi cặn tế bào bằng pipet pastơ.

** Nhuộm tế bào.*

- Dùng pipet pastơ lấy một ít dịch tế bào tủy xương đã cố định, giở xuống lam kính lạnh 3-4 giọt ở độ cao 1,5-20cm tại các vị trí khác nhau. Thời cho các giọt dịch tủy xương dàn đều trên lam kính, hơ lam lạnh ngay trên ngọn lửa đèn cồn.

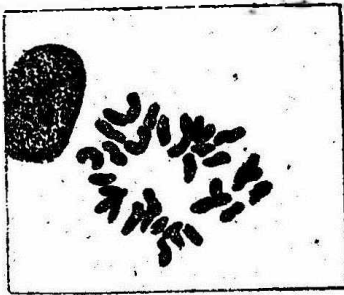
- Phủ đều thuốc nhuộm giemsa mẹ đã được pha loãng 4 lần lên lam kính. Để bất động tiêu bản khoảng 30-40 phút (cũng có thể cố định tế bào bằng axit axetic 50% và nhuộm bằng dung dịch axeto ocxein 2%); sau đó đổ thuốc nhuộm thừa vào lọ (có thể sử dụng lại được), rửa tiêu bản dưới vòi nước để làm sạch thuốc nhuộm còn thừa.

** Đọc kết quả.*

- Đưa tiêu bản quan sát dưới kính hiển vi với vật kính 40X, 90X, thể kính 10X, 16X, tìm các đĩa ki giữa mà trên đó nhiễm sắc thể xếp không chồng chéo lên nhau.

- Qua gương vẽ hấy mạng lưới thị kính vẽ chi tiết các nhiễm sắc thể thuộc phạm vi một tế bào quan sát (hình 12):

– Thiết lập idiogram, phát hiện các kiểu nhiễm sắc thể khác nhau, đếm số lượng nhiễm sắc thể trong tế bào.



Hình 12 – Bộ nhiễm sắc thể của thỏ ($2n=44$).

Trong trường hợp không thể tiêm consixin vào cơ thể để cố định kì giữa của các tế bào, ta tiến hành theo phương pháp sau:

– Lấy ngay dịch tủy xương sống hay xương đùi với số lượng 0,5 – 1ml cho vào môi trường 199 ở 37°C . Thêm 4–5 giọt dung dịch consixin 0,05%, lắc đều ống nghiệm, để yên 2–2,5 giờ.

• Li tâm với vận tốc 1500 – 2000 vòng/phút trong 5 phút, loại bỏ nước mặt, giữ lại cặn lắng. Sau đó tiến hành nhuộm tương tế bào, cố định, nhuộm tiêu

bản giống như phương pháp nhận tiêu bản trực tiếp từ tủy xương như đã trình bày.

– Phương pháp nuôi cấy bạch cầu limpho để làm tiêu bản quan sát hình thái và đếm số lượng nhiễm sắc thể.

Việc sử dụng bạch cầu máu ngoại vi để nghiên cứu nhiễm sắc thể đã được tiến hành từ những năm 30 của thế kỉ này. Tuy nhiên, phương pháp này chỉ được áp dụng rộng rãi sau khi phát hiện ra các tính chất di truyền tế bào của phức hợp protit polisaccarit chiết từ hạt quả đậu mà trước đó đã được sử dụng để ngưng kết không đặc hiệu hồng cầu. Việc sử dụng chế phẩm này (phytochema glutinin) cùng với dung dịch nhuộm tương đã cho phép đơn giản hóa và nhanh chóng thu nhận được số lượng lớn tế bào phân chia. Mặc dầu về chi tiết tác giả có cải tiến chút ít. Song về cơ bản phương pháp vẫn là việc trộn huyết tương chứa bạch cầu theo tỉ lệ xác định với môi trường dinh dưỡng có bổ sung thêm phytochema glutinin vào lọ vô trùng.

Người ta đã phát hiện ra rằng ngoài phytohemagglutinin thì các chất tubeculin, các chất chiết từ nấm men, các polisacarium, thậm chí các chất chiết từ các limpho cũng có khả năng kích thích phân bào trong dịch nuôi cấy bạch cầu.

a) Mục đích yêu cầu:

- Nhằm được phương pháp nuôi cấy bạch cầu limpho.
- Làm tiêu bản để quan sát hình thái và đếm số lượng nhiễm sắc thể và thiết lập idiogram.

b) Vật liệu thiết bị:

- Ống nghiệm vô trùng có tráng qua penixilin
- Dung dịch haperin
- Dung dịch sinh lí có natri xitrat 3,8%
- Phytohemagglutinin
- Consixin 0,05%
- Bơm tiêm
- Tủ lạnh
- Tủ ấm
- Li tâm điện
- Kính hiển vi vật kính $40\times$, $90\times$, thị kính $10\times$, $16\times$

c) *Phương pháp tiến hành:*

+ *Nuôi cấy bạch cầu limpho* (theo Moorhead và các tác giả khác — 1960)

— Chuẩn bị trước một ống nghiệm vô trùng có chứa 1ml dung dịch heparin (heparin được sử dụng dưới dạng dung dịch bằng cách pha loãng gấp 20 lần với dung dịch sinh lí). Có nút bông đã được bôi kín mặt nút bằng penixilin.

— Hút vào bơm tiêm vô trùng một ít heparin và tráng qua thành bơm rồi trích vào ven để lấy máu.

— Lấy 10ml máu từ ven và đưa nhanh vào ống nghiệm có chứa heparin.

— Đặt đứng ống nghiệm vào tủ lạnh ở +4°C trong 30 phút. Nếu trong thời gian đó hồng cầu không lắng xuống thì bổ sung thêm vào dung dịch gelatin 10% theo tỉ lệ 1ml gelatin 10% cho 10ml máu.

— Hút lấy huyết tương loại bỏ hồng cầu,

— Trộn huyết tương với môi trường dinh dưỡng (môi trường 199 hay môi trường Igala) theo tỉ lệ: 1 phần huyết tương với 1,5 phần môi trường dinh dưỡng.

— Cứ 10 ml hỗn hợp trên đem trộn đều với 0,2ml phytohemagglutinin (của hãng Wellenre hay Difco M hay 0,2ml Difco P). Bổ sung thêm chất kháng sinh theo tỉ lệ 100 đơn vị penixilin cho 1ml.

— Đổ hỗn hợp vào các lọ penixilin (mỗi lọ 1,5ml). Thổi vào các lọ nuôi cấy một luồng không khí từ phổi ra để môi trường tràn ngập CO₂ cần thiết. Đặt các lọ nuôi cấy vào tủ ấm 37°C.

— Sau 68 — 69 giờ cho vào các lọ nuôi cấy dung dịch cosixin theo tỉ lệ 0,5 microgam trên 1ml môi trường dinh dưỡng. Thực tế dung dịch cosixin được sử dụng có hiệu quả trong dung dịch sinh lí theo tỉ lệ: 10 microgam chất cosixin trên 1ml dung dịch sinh lí. Lấy 0,075ml dung dịch này bổ sung vào 1,5ml để thu được nồng độ cuối cùng là 0,5 microgam.

— Sau 3 — 5 giờ ủ trong môi trường nuôi cấy có cosixin ta tiến hành làm tiêu bản.

* *Phương pháp làm tiêu bản.*

— Li tâm dịch nuôi cấy với vận tốc 1500—2000 vòng/phút trong 5 phút. Hút bỏ phần nước mặt để lại phần cặn lắng, rồi lắc đều cho tan cặn.

— Nhược trương cặn lắng bằng KCl 0,7% (một ống nghiệm cho thêm 7ml KCl 0,7%). Lắc đều 7 phút. Sau đó li tâm với vận tốc 1500—2000 vòng/phút trong 5 phút. Hút bỏ phần nước mặt, giữ lại phần cặn lắng.

— Cố định tế bào đã nhược trương bằng dung dịch carnoy trong 20—25 phút.

— Các bước còn lại và yêu cầu thí nghiệm giống như phương pháp làm tiêu bản trực tiếp từ tủy xương.

III—NHIỄM SẮC THỂ KHÔNG LỖ

Lần đầu tiên vào năm 1881 nhà tế bào học người Ý tên là E. Balliani tìm thấy nhiễm sắc thể không lỗ trên tuyến nước bọt ấu trùng *Chironomus*.

Sau đó lần lượt phát hiện cấu trúc này còn có ở các tế bào thành ruột, ống măn-pighi và tế bào tuyến nước bọt ấu trùng bộ hai cánh (diptera) nói chung.

Năm 1933 Painter (Mỹ), Heitz và Bauer (Đức) đã thấy rằng nhiễm sắc thể không lồ điển hình hơn cả là ở tế bào tuyến nước bọt ấu trùng ruồi dấm (*Drosophila melanogaster*).

Chiều dài nhiễm sắc thể không lồ gấp 100–156 lần nhiễm sắc thể thường. Nguyên nhân của hiện tượng này là do nhiễm sắc thể không xoắn và phân nào còn do sự mở xoắn của các vòng xoắn nhiễm sắc thể.

Số sợi chất nhiễm sắc cũng nhiều hơn nhiễm sắc thể thường hàng nghìn lần.

Tổ hợp nhiễm sắc thể trong nhân tế bào cũng là lưỡng bội, nhưng các cặp nhiễm sắc thể tương đồng tiếp hợp với nhau nên chúng ở dưới dạng sợi kép sơ cấp.

Những vùng heterochromatin của nhiễm sắc thể không lồ thường được liên kết trong một khối chung gọi là tâm nhiễm sắc (chromocentre). Cùng với khối chung đó, nhiễm sắc thể giới tính Y ở ruồi dấm đục thường thâm nhập vào trong thành phần của tâm nhiễm sắc cho nên không nhìn rõ được.

I. Phương pháp làm tiêu bản tạm thời để quan sát cấu tạo nhiễm sắc thể không lồ tuyến nước bọt ấu trùng ruồi dấm (*Drosophila Melanogaster*).

a) Mục đích yêu cầu.

— Nắm được phương pháp làm tiêu bản tạm thời nhiễm sắc thể không lồ tuyến nước bọt ấu trùng ruồi dấm.

— Quan sát được các đĩa sáng đĩa tối trên một đoạn nhiễm sắc thể, vẽ được toàn bộ bộ nhiễm sắc thể không lồ.

b) Vật liệu và thiết bị.

— Ấu trùng ruồi dấm có kích thước lớn.

— Kính hiển vi với vật kính 40 × thị kính 10 × hoặc 16 ×.

— Kim phân tích.

— Kính lúp.

— Lam kính và lamén sạch,

— Bút lông.

— Giấy thấm.

— Đĩa đồng hồ — Dụng cụ vẽ trên kính hiển vi:

— Hóa chất: dung dịch sinh lí 0,6% NaCl.

axeto cacmin 5%

axit axetic 45%.

c) Phương pháp tiến hành.

+ *Mô dôi và tách tuyến nước bọt.*

Đặt ấu trùng đã rửa sạch qua nước cất lên lam kính. Nhỏ vài giọt dung dịch sinh lí NaCl 0,6% hoặc dung dịch có nồng độ 0,73% NaCl lên ấu trùng.

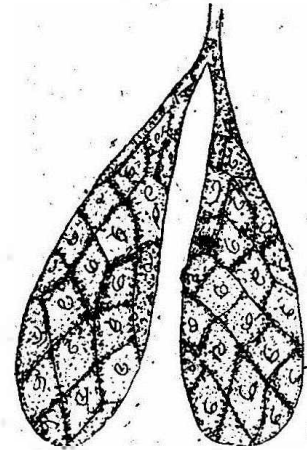
— Đưa lam kính có ấu trùng lên bàn kính hiển vi với độ phóng đại nhỏ, hoặc đưa lên kính lúp 2 mắt Meofita.

— Cả hai tay cầm kim phân tích. Kim ở tay trái giữ chặt phần miệng (phần miệng có kitin màu đen). Kim ở tay phải thì đặt nằm trên thân ấu trùng ấn và kéo dài xuống phần dưới. Khi đã tách đôi thân có thể thấy tuyến nước bọt gồm các tế bào trong suốt bên trong có nhân màu đen hình giải dài đó là các nhiễm sắc thể. Mỗi một ấu trùng có 2 tuyến nước bọt nằm tách nhau, mỗi tuyến có một ống riêng, cả 2 ống riêng của 2 tuyến cùng đổ vào một ống chung (hình 13), xung quanh tuyến nước bọt có các thể mỡ bao quanh.

— Dùng kim phân tích loại bỏ các mô thừa ra khỏi lam kính, tách hết các thể mỡ, đưa tuyến nước bọt vào đĩa đồng hồ.

+ Nhuộm tuyến nước bọt bằng axeto cacmin:

— Nhỏ 1 – 2 giọt axeto cacmin 5% vào tuyến nước bọt để nhuộm trong 15 – 20 phút. Muốn mẫu nhuộm màu tốt thì đập tiêu bản bằng một đĩa đồng hồ, để trong tủ ấm ở điều kiện nhiệt độ 37°C.



Hình 13 — Tuyến nước bọt ấu trùng ruồi dấm.

— Đưa tuyến nước bọt đã nhuộm lên lam kính, nhỏ lên tiêu bản 1 giọt axit axetic 45%, đập lam và dùng ngón tay trở ấn nhẹ tiêu bản,

+ Quan sát cấu tạo nhiễm sắc thể không lồ*:

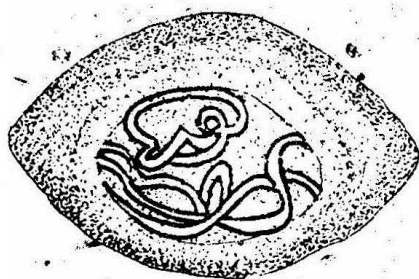
— Đưa tiêu bản lên kính hiển vi với vật kính 40 × thị kính 10 × hoặc 16 × quan sát và vẽ qua gương vẽ 1 tế bào chứa võ màng nhân trong đó chứa nhiễm sắc thể không lồ (hình 14).

— Phát hiện các tế bào màng nhân đã vỡ, tìm tế bào có bộ nhiễm sắc thể tung ra rõ nhất, qua hệ thống gương vẽ, phác lại cấu tạo chung của từng nhiễm sắc thể.

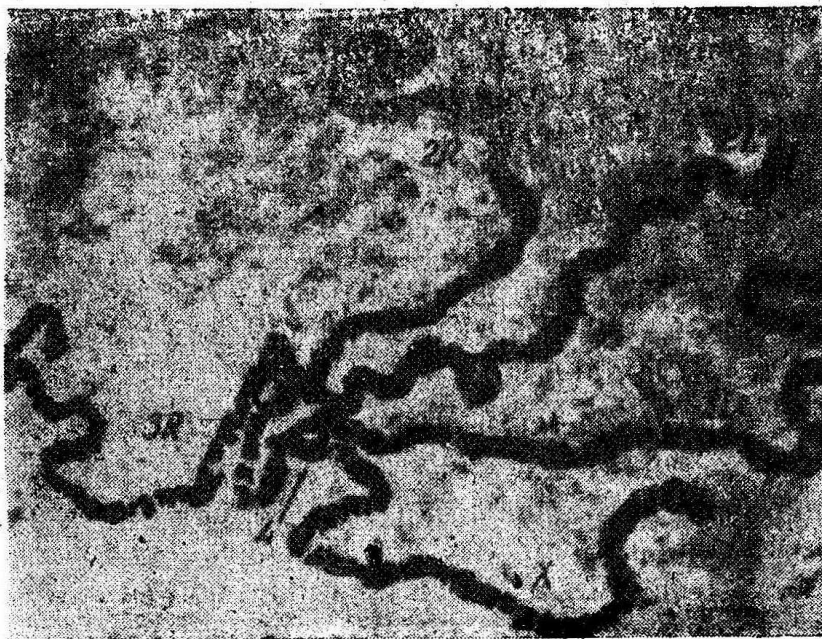
* Các nghiên cứu của Painter, Brisges... đã cho thấy rằng nhiễm sắc thể không lồ có nhiều đặc điểm như số nhiễm sắc thể trong nhân bằng số đơn bội, cho nên các dạng tương đồng là trạng thái tiếp hợp của tế bào. Ngoài ra, nhiễm sắc thể là dạng nhiều sợi (polltene). Trên tiêu bản của ruồi dấm đầu các dải ngang, thấy rõ các dải tối và sáng. Để nhận biết các nhiễm sắc thể và các dải người ta dùng kí hiệu: số 1 cho nhiễm sắc thể X, các chỗ 2L, 2R là vai trái và phải của nhiễm sắc thể thứ 2, 3L và 3R là vai trái và vai phải của nhiễm sắc thể thứ 3; số 4 là nhiễm sắc thể thứ 4. Nhiễm sắc thể thứ 2 và thứ 3 là dài nhất. Nhiễm sắc thể thứ 4 là ngắn nhất.

Tất cả 4 nhiễm sắc thể được chia làm 102 đoạn. Nhiễm sắc thể X có 20 đoạn (từ 1 đến 20). Nhiễm sắc thể thứ 2 có 40 đoạn ở 2L (từ 21 đến 40) và 20 đoạn ở 2R (từ 41 đến 60). Nhiễm sắc thể thứ 3 có 40 đoạn: 20 đoạn ở 3L (từ 61 – 80) và 20 đoạn ở 3R (từ 81 đến 100). Nhiễm sắc thể thứ 4 có 2 đoạn 101 và 102. Các nhiễm sắc thể nhiều sợi của ruồi dấm có chiều dài tính bằng micrôn: nhiễm sắc thể X là 220 μm , nhiễm sắc thể thứ 2: 460 μm , nhiễm sắc thể thứ 3 là 485 μm , nhiễm sắc thể thứ 4 là 15 μm .

— Quan sát các đĩa sáng, đĩa tối trên một đoạn nhiễm sắc thể, phân biệt 4 nhiễm sắc thể về kích thước và số đĩa sáng đĩa tối trên các nhiễm sắc thể (Hình 15).



Hình 14 — Tế bào tuyến nước bọt ấu trùng ruồi dấm có chứa nhiễm sắc thể không lồ.



Hình 15 — Nhiễm sắc thể không lồ tuyến nước bọt ấu trùng ruồi dấm. R là vai trái, L là vai phải của từng nhiễm sắc thể.

2. Phương pháp làm tiêu bản tạm thời để quan sát cấu tạo nhiễm sắc thể không lồ tuyến nước bọt ấu trùng Chironomus.

a) Mục đích yêu cầu :

- Nhằm được phương pháp làm tiêu bản trên ấu trùng chironomus.
- Quan sát được cấu tạo của nhiễm sắc thể không lồ của ấu trùng chironomus.

b) Vật liệu và thiết bị :

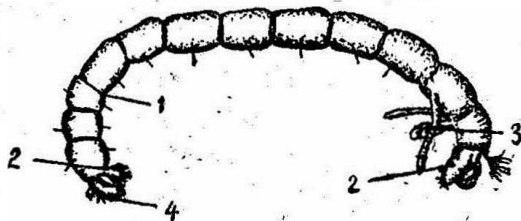
- Ấu trùng chironomus.
- Kính hiển vi với vật kính 40 ×, thị kính 10 × hoặc 16 ×.
- Mặt kính đồng hồ.
- Lam kính và lamén sạch.
- Kim phân tích.
- Giấy thấm.
- Tủ ẩm.
- Hóa chất: dung dịch sinh lí 0,6% NaCl
axit axetic 45%
axeto cacmin 5%

c) *Phương pháp tiến hành:*

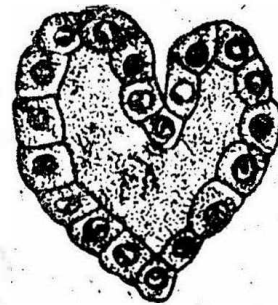
— *Phương pháp mổ dọt và tách tuyến nước bọt.*

— Đặt ấu trùng chironomus (hình 16) lên lam kính. Nhổ lên ấu trùng 1–2 giọt dung dịch sinh lí lạnh (trong dung dịch sinh lí lạnh ấu trùng chironomus chuyển động yếu).

Cơ thể ấu trùng gồm các đốt. Trước đốt thứ nhất là đầu, cuối đốt sau cùng là cơ quan sinh dục.



Hình 16 — Ấu trùng chironomus:
1. Đường cắt giữa đốt 3 và đốt 4;
2. Chân giả; 3. Mang; 4. Đầu.



Hình 17.— Tế bào tuyến nước bọt ấu trùng chironomus.

Tuyến nước bọt của chironomus nằm giữa đốt thứ 2 và thứ 3 của ấu trùng. Để tách chúng dùng lưỡi dao bào mổ giữa đốt thứ 3 và đốt thứ 4.

— Sử dụng kim phân tích tách 2 tuyến nước bọt không màu trong suốt, chúng có 2–5 thùy (hình 17), các tế bào có nhân rất lớn ngay cả lúc chưa nhuộm màu vẫn nhìn thấy được. Vẽ hình dạng chung của tuyến.

+ *Nhuộm tiêu bản tuyến nước bọt:*

Nhuộm tuyến nước bọt bằng axeto cacmin 5% trong đĩa đồng hồ có đậy bằng 1 đĩa đồng hồ khác, đặt vào tủ ấm 37°C trong thời gian 1 giờ.

3. Làm tiêu bản quan sát cấu tạo nhiễm sắc thể không lồ.

— Đưa tuyến nước bọt đã nhuộm màu lên lam kính, nhỏ vào tiêu bản một giọt axit axetic 45% (chuyển tuyến nước bọt bằng pipet hay bằng phân tích).

— Đậy lamen lại, dùng giấy thấm hút hết axit axetic còn thừa. Đưa tiêu bản lên kính hiển vi, chọn lấy tế bào có các thể nhiễm sắc ăn màu tốt trong nhân tế bào: Vẽ lại tế bào đó (muốn vẽ chính xác thì dùng gương vẽ).

Trong tế bào tuyến nước bọt chironomus, cũng như của ruồi dấm, có số lượng nhiễm sắc thể lưỡng bội được quan sát ở trạng thái đơn bội (giống nhau về kích thước và cấu trúc nhiễm sắc thể).

— Dùng ngón tay cái ấn nhẹ tiêu bản tạo điều kiện cho tế bào dàn mỏng thành một lớp, có nhiều tế bào vỡ màng nhân, nhiễm sắc thể không lồ tung ra.

— Đưa tiêu bản lên kính hiển vi ở vật kính 40× thị kính 10× hoặc 16×, quan sát cấu tạo nhiễm sắc thể không lồ, rồi dùng gương vẽ, cẩn thận vẽ lại nhiễm sắc thể không lồ trong một tế bào rõ nét nhất

IV—PHƯƠNG PHÁP XÁC ĐỊNH VÙNG ĐỒNG NHIỄM SẮC (EUCHROMATIN) DỊ NHIỄM SẮC (HETERCHROMATIN) VÀ CHẤT NHIỄM SẮC GIỚI TÍNH

I. Phương pháp phát hiện vùng đồng nhiễm sắc và dị nhiễm sắc.

Khi nhuộm nhiễm sắc thể bằng thuốc nhuộm kiềm tính, hoặc bằng các thuốc nhuộm đặc biệt, một số vùng trên nhiễm sắc thể bắt màu thẫm hơn, gọi là vùng dị nhiễm sắc còn vùng ít nhuộm màu hơn gọi là vùng đồng nhiễm sắc.

Về vai trò của vùng dị nhiễm sắc, nhiều tác giả cho rằng: dị nhiễm sắc phân bố ở vị trí tương ứng ở các nhiễm sắc thể khác nhau (vùng eo cấp I có chứa tâm động, vùng eo cấp II, nơi hình thành nhân bé), hầu như không mang gen cơ bản (i về phương tiện di truyền), tham gia cấu tạo nên nhiễm sắc thể giới tính (nhiễm sắc thể Y ở *Drosophila melanogaster* hầu như gồm toàn là chất dị nhiễm sắc), nhiễm sắc thể phụ (Extrachromosome) và tâm sắc (chromo-center).

a) Mục đích yêu cầu:

— Nhận biết vùng đồng và dị nhiễm sắc, thấy được sự phân hóa theo chiều dài của nhiễm sắc thể.

— Bước đầu nắm được phương pháp phát hiện vùng đồng và dị nhiễm sắc ở nhiễm sắc thể thực vật.

b) Vật liệu và thiết bị:

— Rễ hành, củ hành,

— Dung dịch consixin, chất cố định carnoy

— Cồn etilic tuyệt đối hoặc 96%. Axit axetic 45%, anbumin hòa lẫn với glixerin, thuốc nhuộm Feulgen, thuốc nhuộm quinacrin, lam, lamén, nhựa dán cao su, kính hiển vi thường, nước cất, tủ lạnh và một số dụng cụ để làm tiêu bản.

c) Các bước tiến hành:

(+) Phương pháp của Canio G.Vosa (1970):

— Cố định sơ bộ rễ hành trong dung dịch cồn sixin 0,05% trong 4—5 giờ.

— Tiếp đó, cố định bằng dung dịch cồn axetic 3: 1 trong 2 ngày.

— Chuyển mẫu vật sang cồn 90° và giữ ở nhiệt độ 4—6°C cho đến lúc sử dụng.

— Rửa mẫu vật bằng nước cất.

— Xử lí lamén bằng phương pháp khô, lạnh («dryice») hoặc bằng anbumin hòa lẫn glixerin.

— Nhuộm bằng dung dịch quinacrin 0,5% từ 10—15 phút.

— Làm tiêu bản ép trong axit axetic 40%.

— Làm sáng tiêu bản bằng chuyển qua nước cất xung quanh lamén gắn bằng nhựa dán cao su.

— Tiêu bản giữ trong tủ lạnh một đêm.

— Quan sát dưới kính hiển vi thường.

— Muốn chụp ảnh hiển vi cần có kính lọc ánh sáng Kodak TriXpan.

+) Phương pháp của G.Haskell và A.B. Wills, (1968):

— Cố định rễ hành mọc ở nhiệt độ trong phòng 20–22°C trong dung dịch carnoy cồn axetic 3:1) và nhuộm bằng phương pháp Feulgen làm tiêu bản ép để quan sát dưới kính hiển vi.

— Cũng có thể đặt củ hành trong một chậu thủy tinh nhỏ có để lẫn rêu để làm ẩm và giữ trong tủ lạnh 3°C trong 5 ngày, sau đó mới cố định và nhuộm như trên.

Làm tiêu bản ép để quan sát dưới kính hiển vi.

Vẽ hình quan sát được dưới kính hiển vi và vẽ tượng trình và ghi chú thích.

2. Phương pháp xác định chất nhiễm sắc giới tính.

Chất nhiễm sắc giới tính dễ tìm thấy trong nhân tế bào niêm mạc miệng. Theo quan niệm hiện đại thì chất nhiễm sắc giới tính do nhiễm sắc thể X ở trạng thái không hoạt động hình thành. Số nhân có chứa chất nhiễm sắc giới tính ở đàn bà là 40% (biến động từ 20 đến 71%), ở đàn ông thì 0–0,3% (A.M. Ponomorenco 1964). Vậy là chất nhiễm sắc giới tính chủ yếu phát hiện thấy ở đàn bà, còn đàn ông khá hiếm. Khi số lượng nhiễm sắc thể X của đàn ông sai khác với số lượng bình thường thì có thể phát hiện được chất nhiễm sắc giới tính. Ví dụ ở hội chứng Clinfelter (có số nhiễm sắc thể trong tế bào xôma là 47, trong đó có 3 nhiễm sắc thể giới tính là XXY). Ở đàn bà có hội chứng Turner (có số nhiễm sắc thể ở tế bào xôma là 45 trong đó có một nhiễm sắc thể giới tính X) thì không thấy chất nhiễm sắc giới tính. Chất nhiễm sắc giới tính cũng được phát hiện thấy ở một số loài thực vật có nhiễm sắc thể X khác nhau.

a) Mục đích yêu cầu:

— Nhằm được phương pháp làm tiêu bản xác định chất nhiễm sắc giới tính ở người.

— Quan sát được chất nhiễm sắc giới tính ở tế bào niêm mạc miệng phụ nữ.

b) Vật liệu và thiết bị:

— Niêm mạc miệng phụ nữ.

— Lam kính và lamen sạch.

— Cái nạo nhỏ.

— Ống nhỏ giọt.

— Kính hiển vi.

— Giấy thấm.

— Metanol.

— Axeto cacmin 5% (hoặc axeto ocxein).

c) Phương pháp tiến hành:

+ Lấy tế bào niêm mạc miệng:

— Dùng một nạo nhỏ, nhẹ nhàng gạt lấy một ít tế bào niêm mạc miệng (phía trong bề mặt má).

- Phết một ít tế bào niêm mạc lên lam kính sạch.

+ *Cố định tế bào* :

- Nhỏ lên lam kính trên 2 - 3 giọt metanol 96% cố định tế bào 15 - 20 phút thấm metanol còn thừa bằng giấy thấm.

- Đưa lam kính đã cố định hong khô ở nhiệt độ phòng. Bản kính có tiêu bản này có thể để một thời gian lâu khi chưa cần tới.

+ *Nhuộm và quan sát tiêu bản* :

- Đưa bản kính đã cố định nhuộm bằng 1 - 2 giọt axeto cacmin 5% (hoặc axeto ocxein) Đậy bằng mặt kính đồng hồ trong suốt thời gian nhuộm. Sau khoảng 2 - 5 phút có thể đưa ra quan sát dưới kính hiển vi.

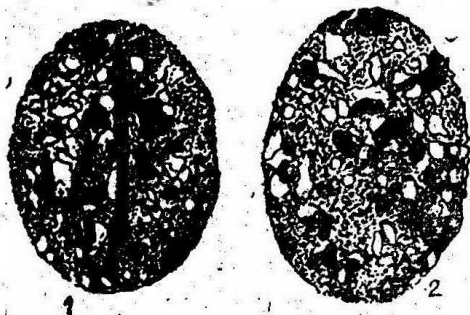
- Bắt đầu quan sát ở độ phóng đại nhỏ, sau đó chuyển sang quan sát ở độ phóng đại lớn. Trên thị trường của kính hiển vi có thể nhìn rất rõ nhân tế bào có dạng hình cầu, hình ôvan, có màng nhân rõ nét.

- Tìm và quan sát các nhân có chứa nhiễm sắc chất giới tính. Chất nhiễm sắc giới tính nằm sát màng nhân và thay đổi hình dạng (hình 18). Chúng có thể có hình tam giác, ôvan, hình có góc vuông và các dạng hình khác.

- Xác định số % tế bào chứa chất nhiễm sắc giới tính (số lượng tính toán không được thấp dưới 100 nhân ở kì trung gian). Ở đàn bà chất nhiễm sắc giới tính chiếm 20 - 60% số nhân tế bào. Các nhân còn lại không phát hiện thấy. Số lượng khối chất nhiễm sắc giới tính trong các tế bào bằng số nhiễm sắc thể X trừ đi một đơn vị. Vì vậy ở đàn

bà trong mỗi nhân phải có một thể chất nhiễm sắc giới tính. Ở đàn ông bình thường chất nhiễm sắc giới tính thực tế không có (trong một số trường hợp có thể gặp nhưng không đáng kể).

- Vẽ lại tiêu bản thực tại quan sát được trên kính hiển vi.



Hình 18 - Nhân tế bào niêm mạc miệng của người:

1. Nhân tế bào phụ nữ có nhiễm sắc chất giới tính; 2. Nhân tế bào đàn ông, không có nhiễm sắc chất giới tính.

CHƯƠNG II

CƠ SỞ PHÂN TỬ CỦA TÍNH DI TRUYỀN

Ta đã biết, ADN là thành phần cơ bản của các nhiễm sắc thể trong nhân tế bào và nhiễm sắc thể của mỗi loài động, thực vật đều chứa ADN đặc thù. Tính đặc thù về loài được xác định bởi số nucleotit trong phân tử ADN, bởi trình tự sắp xếp của các nucleotit và ngay cả bởi tỉ lệ $\frac{\text{Guanin} + \text{Xitozin}}{\text{Adenin} + \text{Timin}}$

Phản ứng Feulgen trong ADN dựa trên cơ sở môi trường tác của thuốc thử Schiff với các nhóm andehrit của đường desoxyriboza. Trong phân tử ADN có các nhóm andehit liên kết với nhau, bởi vậy người ta sơ bộ giải phóng chúng bằng việc thủy phân trong axit clohydric loãng ở 60°C. Do thủy phân, các bazo purin (guanin và adênin) bị tách ra khỏi phân tử ADN và các gốc của phân tử ADN có các nhóm andehit tự do được giải phóng ra. Thuốc thử Schiff là 1 hợp chất không bền vững và dễ dàng kết hợp với các nhóm andehit tự do, do vậy thu được 1 chất bắt màu. Axit desoxyribonucleic chủ yếu chứa trong nhiễm sắc thể, bởi vậy thuốc thử Schiff chỉ nhuộm nhân, đặc trưng nhuộm màu của nhân trong các tế bào là không giống nhau. Chẳng hạn, nhân của vùng phân chia thường có màu tím đỏ tươi, còn nhân từ các vùng bao rế còn nhuộm màu tương đối đồng nhất và cường độ yếu. Khi đó, hạch nhân không bị nhuộm màu. Trong các tế bào ở các pha khác nhau của gián phân chỉ có các nhiễm sắc thể bị nhuộm màu. Màu tím đỏ của các nhiễm sắc thể xác nhận về sự định khu của các phân tử ADN trong chúng, còn theo cường độ nhuộm màu có thể nhận định về trạng thái của phức hợp desoxyribonucleoprotein.

I—PHƯƠNG PHÁP HÓA TỎ CHỨC NHẪM PHÁT HIỆN ADN TRONG CÁC TẾ BÀO NHỜ PHẢN ỨNG FEULGEN—SCHIFF

1. Mục đích.

- Chuẩn bị tiêu bản cố định nhuộm ADN theo Feulgen — Schiff
- Quan sát và vẽ các tế bào nhuộm theo Feulgen. Đặc biệt chú ý đến cường độ nhuộm màu của nhân và nhiễm sắc thể chỉ ra sự định khu của ADN.

2. Vật liệu và thiết bị.

- Những lát cắt hiển vi rế hay diềm sinh trưởng của thân cây nghiên cứu dán lên các lam kính.
- Kính hiển vi
- Tủ ẩm
- Ống thủy tinh hình trụ để nhuộm tiêu bản
- Ống đong
- Thuốc thử Schiff
- Dung dịch 1% Vert claire
- Natri Bisunfit
- HCl đặc (tỉ trọng 1,19)
- Cồn Etilic 96°
- Cồn etilic 100°
- Cacbonxilen.
- Xilen
- Keo Canada
- Nước cất
- Chì màu

3. Các bước tiến hành.

+ Chuẩn bị thuốc thử Schiff (xem chương 1).

+ Nhuộm tiêu bản

Đồ thuốc thử Schiff vào 1 ống thủy tinh hình trụ và ngâm tiêu bản trong đó 1 – 2 giờ.

Chuẩn bị dung dịch nước sunfuro (xem chương 1) và đổ nó vào 3 ống thủy tinh hình trụ khác nhau. Ngâm các tiêu bản đã nhuộm trong thuốc thử Schiff vào các ống này theo trình tự mỗi ống 2 – 5 phút.

Bảng 3

Trình tự các bước tiến hành để phát hiện ADN trong tế bào nhờ thuốc thử Schiff

Thứ tự	Thuốc thử	Biện pháp với tiêu bản	Thời gian	Ghi chú
1	Xilenparafin I	Xếp vào ống thủy tinh hình trụ	10–15 phút	
2	II	»	10–15	
3	Cồn + xilen (1 phần cồn 100% + 1 phần xilen)	»	3–5	
4	Cồn 96%	Rửa bằng ống nhỏ giọt xếp vào ống thủy tinh hình trụ	30 giây	
5	–	»	5–10 phút	
6	Cồn 45%	»	3–5	
7	Nước cất	»	3–5	
8	1N HCl	Rửa bằng ống nhỏ giọt	30 giây	
9	nt	Xếp vào ống thủy tinh hình trụ	8 phút	
10	nt	»	1–5 phút	
11	Nước cất	Rửa bằng ống nhỏ giọt	30 giây	
12	Thuốc thử Schiff	Xếp vào ống thủy tinh hình trụ	1–3 giờ	
13	Nước sunfua I	–nt–	2 phút	
14	– II	–nt–	2–5 phút	
15	– III	–nt–	2–5	
16	Nước vôi	–nt–	15 phút	
17	Nước cất	–nt–	1–2	
18	1% lục nhạt (Vert-claire)	–nt–	1–2	
19	Nước vôi	–nt–	–5–	
20	Cồn 90%	Rửa bằng ống nhỏ giọt	3 giây	Rửa dưới vòi nước chảy
21	–	Xếp vào ống hình trụ	1–2 phút	
22	Cồn 100%	Rửa bằng ống nhỏ giọt	3 giây	
23	–	Xếp vào ống hình trụ	1–5 phút	
24	Cồn + xilen (1 phần cồn 100% + 1 phần xilen)	–nt–	1 phút	
25	Nhựa thơm xilen I	–nt–	5–10 phút	
26	» II	–nt–	5	
27	Nhựa thơm	Đặt mẫu vật vào nhựa thơm	1	
28	Quan sát tiêu bản dưới kính hiển vi và dùng bút chì màu vẽ tế bào chỉ ra trên hình sự định khu và hàm lượng tương đối của ADN.			

Để phát hiện ADN người ta sử dụng tiêu bản cố định các lát cắt dọc mô phân sinh rễ hành, quả đậu, và các cây khác. Cố định mẫu vật trong chất cố định Carnoy hay navaxin (xem chương 1). Thời gian cố định có thể ngắn hơn. Sau đó mẫu vật cần được khử nước, tẩm parafin và cắt trên máy cắt lát (microtom) các lát cắt hiển vi mỏng được dán lên lam kính. Trình tự nhuộm các bản cắt này để phát hiện ADN như trong bảng 3.

Thuốc thử Schiff hoàn toàn không nhuộm tế bào chất. Bởi vậy để nhuộm tế bào chất và màng tế bào, người ta sử dụng việc nhuộm bổ sung bằng dung dịch 1% vest Claire trong nước hay trong rượu khi đó tế bào chất bị nhuộm màu lục nhạt. Người ta cũng dùng cả dung dịch 1% Orange G trong nước làm thuốc nhuộm bổ sung. Ở trường hợp này, tế bào chất có màu vàng da cam.

II — PHÁT HIỆN ADN VÀ ARN TRONG TẾ BÀO NHỜ NHUỘM TIÊU BẢN BẰNG LỤC METIL VỚI PIRONIN

I. Mục đích.

- Chuẩn bị tiêu bản cố định nhuộm lục metil với Pironin.
- Quan sát tiêu bản thu được dưới kính hiển vi và bằng bút chì màu, vẽ hình chỉ ra sự định khu của ADN và ARN trong tế bào.

2. Vật liệu và thiết bị.

Các lát cắt hiển vi dọc rễ hành hay các cây khác dán lên lam kính. Kính hiển vi, chì màu, ống đồng, các thuốc thử cần cho việc nhuộm và dính tiêu bản cố định, dung dịch lục metil với pironin (dung dịch A). Buffer axetat pH = 4,8 (dung dịch B). Axeton, xilen.

3. các bước tiến hành.

Phản ứng cho phép phát hiện ADN và ARN bằng cách nhuộm lục metil với pironin được xác định bởi sự có mặt trong phân tử ADN và ARN các nhóm phốt phát axit (HPO_4). Lục metil nhuộm các phân tử ADN thành màu lục, còn pironin nhuộm các phân tử ARN thành màu đỏ. Cường độ bắt màu phụ thuộc vào lượng axit nucleic. Khi ấy cần nhớ rằng, pironin không phải là thuốc thử đặc hiệu đối với ARN. Bởi vậy, cần sử dụng các tiêu bản đối chứng: trước khi nhuộm được xếp vào dung dịch ribonucleaza trong nước và đặt vào tủ ấm $37^{\circ}C$ trong 2 — 3 giờ. Trong thời gian này sự thủy phân các phân tử ARN xảy ra trong các tế bào. Có thể sử dụng axit tricloaxetic 5—10% thay cho ribonucleaza. Các tiêu bản đối chứng được nhuộm bằng phương pháp thông thường đồng thời với các tiêu bản nghiên cứu. Nếu như các tiêu bản đối chứng được nhuộm bằng pyronin thành màu đỏ yếu thì tức là trong chúng có chứa ARN bị thủy phân dưới tác dụng của ribonucleaza.

Chuẩn bị 2 dung dịch: dung dịch A (lục Metil với pironin) và dung dịch B (Buffer axetat).

Dung dịch: gồm 3 phần: 17,5ml dung dịch 5% pironin trong nước, 10ml dung dịch 2% lục metil trong nước, 250 ml nước.

Mỗi thành phần được chuẩn bị riêng và sau đó đổ vào bình có nút nhám và giữ ở chỗ tối, tốt nhất là trong tủ lạnh. Dung dịch A có thể sử dụng trong vài tháng.

Sau khi chuẩn bị dung dịch 2% lục metil trong nước, cần tẩy sạch nó khỏi tạp chất tím metil bằng cách chiết rút với clorofoc. Để làm công việc này, đổ 1 lượng bằng nhau clorofoc vào dung dịch lục metil, lắc đều và để lắng 1-2 ngày. Sau đó, bằng phễu chiết tách lớp mặt của dung dịch chứa lục metil khỏi lớp dưới chứa tạp chất tím metil. Thao tác này được lặp lại 2-3 lần hay nhiều hơn.

Chuẩn bị dung dịch B: (Buffer axetat pH 4,8).

+ Đổ 1,2ml axitaxetic đã vào 1 bình định mức và bổ sung nước cất cho đủ 100ml.

+ Đổ 2,72g Na axetat ($\text{CH}_3\text{COONa.H}_2\text{O}$) vào bình định mức và bổ sung nước cất cho đủ 100ml.

Sau đó, hóa hợp cả 2 dung dịch vào 1 bình. 77ml dung dịch 1 và 100ml dung dịch 2. Ta sẽ thu được Buffer axetat pH 4,8. Trước khi nhuộm tiêu bản, các dung dịch A và B được trộn theo tỉ lệ 1 : 1.

Nhuộm các tiêu bản chuẩn bị từ mẫu vật đã cố định bằng lục metil với pironin. Để làm việc này thường lấy rễ hành hay rễ các cây khác. Việc cố định mẫu vật tốt nhất, là theo Carnoy. Chuẩn bị các lát cắt hiển vi và dán lên các lam kính theo phương pháp tế bào học thông thường. Trình tự các bước tiến hành theo bảng 4 sau đây.

Bảng 4

Thứ tự	Thuốc thử	Biện pháp đối với tiêu bản	Thời gian
1	Xilen parafin I	Xếp vào ống thủy tinh hình trụ	10-15 phút
2	» II	»	10-15 -
3	Cồn+xilen (1 phần cồn 100% + + 1 phần xilen)	»	3-5 -
4	Cồn 96%	Rửa bằng ống nhỏ giọt	30 giây
5	» »	Xếp vào ống thủy tinh hình trụ	5-10 phút
6	» 45%	»	3-5 »
7	Nước cất	»	3-5 »
8	-	Rửa bằng ống nhỏ giọt	30 giây
9	Lục metil với pironin	Xếp vào ống hình trụ	20 phút
10	Nước cất I	Tráng trong ống thủy tinh hình trụ*	30 giây
11	- II	»	30 -
12	Axeton	Rửa bằng ống nhỏ giọt	30 -
13	Axeton+xilen I (9 phần axeton+1 phần xilen)	»	30 -
14	Axeton+Xilen II (5 phần xilen+5 phần axeton)	»	30 -
15	Axeton+Xilen III (1 phần axeton+9 phần Xilen)	Rửa bằng ống nhỏ giọt	30 -
16	Xilen nhựa thơm I	»	30 giây
17	» II	»	-
18	Nhựa thơm Canada	Đưa tiêu bản vào nhựa thơm Canada.	1 phút
19	Quan sát tiêu bản dưới kính hiển vi và dùng bút chì màu vẽ và chỉ ra sự định khu của ADN và ARN trong tế bào.		

* Sau khi xử lí nước cất, tiêu bản cần được thấm khô bằng giấy lọc. Mẫu vật cần được cố định sơ bộ, tẩm parafin. Các lát cắt có tẩm parafin sản xuất trên Microtom phải được dán trên các lam kính.