

THỰC HIỆN TIÊU BẢN HIỂN VI BỘ NHIỆM SẮC THỂ CỦA CHÂU CHẤU (*OXYA CHINENSIS*) NHẪM NÂNG CAO CHẤT LƯỢNG DẠY HỌC CÁC BÀI THỰC HÀNH DI TRUYỀN HỌC CHƯƠNG TRÌNH SINH HỌC PHỔ THÔNG

ThS. LÊ MINH ĐỨC - ThS. ĐẶNG THỊ NGỌC THANH*

1. Sinh học (SH) là môn khoa học thực nghiệm, vì vậy vai trò của thực hành thí nghiệm là rất quan trọng. Các bài thực hành sẽ giúp học sinh (HS) rèn luyện kỹ năng tư duy, rèn luyện các thao tác thực hành, tập cách bố trí thí nghiệm, làm cho các em yêu thích môn học. Tuy nhiên, khi giảng dạy "Thực hành quan sát hình thái nhiễm sắc thể (NST)" (bài 14 - SH9) hay "Thực hành quan sát các dạng đột biến số lượng NST trên tiêu bản cố định và trên tiêu bản tạm thời" (bài 7 - SH12), giáo viên (GV) thường gặp một số khó khăn gây trở ngại cho tiến trình dạy học như: hiện nay trên thị trường hầu như không có nơi cung cấp các tiêu bản kiểu nhân của các loài động thực vật (giun đũa, châu chấu, ếch, hành, lúa...) như trong SH9 giới thiệu; bộ tiêu bản kiểu nhân của người (Viện Nghiên cứu hạt nhân sản xuất) có thể dùng cho dạy học dạng bài thực hành này nhưng giá thành còn cao. Các tiêu bản về nguyên phân, giảm phân nếu được dùng thay cho mục đích này thì cũng khó quan sát được hình thái và đếm số lượng NST do chúng thường bị chồng chéo lên nhau. Trong khi đó, châu chấu là đối tượng dễ tìm thấy ngoài tự nhiên hoặc mua trên thị trường với giá thành rẻ. Chúng có bộ NST lớn dễ quan sát; NST giới tính đặc trưng cho kiểu XX ở con cái (♀) và XO ở con đực (♂). Thao tác thực hiện tiêu bản giảm phân ở châu chấu ♂ khá dễ dàng và được mô tả trong nhiều giáo trình thực hành Di truyền học. Ở kì giữa I và II, kì sau I và II trong giảm phân, nếu có cách làm cho các NST dàn đều ra thì việc quan sát hình thái và đếm số lượng bộ NST của một loài sẽ thuận lợi hơn rất nhiều.

Dựa trên quy trình thực hiện tiêu bản hiển vi giảm phân ở châu chấu, chúng tôi cải tiến một số thao tác để tạo ra bộ tiêu bản phục vụ việc quan sát hình thái và đếm số lượng NST của châu chấu ♂ ($2n=23, n=11$ hoặc 12). Quy trình đề xuất có thể được dùng làm tài liệu tham khảo cho GV, HS, góp phần bổ sung nguồn tiêu bản cố định nhằm nâng cao chất lượng giảng

dạy các bài thực hành Di truyền học ở các trường phổ thông.

2. Phương pháp nghiên cứu

1) **Chuẩn bị mẫu vật.** Chọn châu chấu ♂ có kích thước từ 2-2,2cm. Dùng tay kéo nhẹ để tách phần bụng và ngực của châu chấu, dùng kim mũi mác gạt nhẹ phần bụng (từ đốt cuối cùng lên trên phần đốt sát ngực) sẽ thấy lộ ra tinh hoàn; tách bỏ phần thể mỡ màu vàng cam, giữ lại tinh hoàn có hình dạng nải chuối màu trắng gồm nhiều túi tinh.

2) **Thực hiện tiêu bản tạm thời:** - **Sốc nhuộm trương mẫu vật:** Tinh hoàn châu chấu được nhuộm trương trong dung dịch natri citrate ở các nồng độ 0,2%, 0,3%, 0,4%, 0,5% trong 30 phút; - **Cố định mẫu vật:** Các túi tinh được cố định trong dung dịch Carnoy từ 2-4 giờ; - **Nhuộm mẫu vật:** Nhuộm mẫu trong dung dịch aceto-orcein ở các nồng độ 1%, 1,5%, 2% trong thời gian 5 phút, 10 phút, 15 phút, 20 phút, 25 phút, 30 phút ở điều kiện nhiệt độ phòng và đặt trong tủ ẩm 60°C; - **Lên kính:** Nhỏ lên mẫu 1 giọt nước hoặc 1 giọt acid acetic 45%. Đậy lamelle, dùng ngón tay cái ấn nhẹ vài lần lên tiêu bản giúp tế bào (TB) và NST dàn đều.

3) **Thực hiện tiêu bản cố định.** Chuyển tiêu bản tạm thời đạt yêu cầu thành tiêu bản cố định. Các tiêu bản tạm thời đạt yêu cầu là tiêu bản có nhiều TB đang ở kì giữa I/II hoặc kì sau I/II, gồm các bộ NST ($2n$ hoặc n) dàn đều, màu sắc tốt.

Thao tác gồm các bước sau: Đặt tiêu bản trong ngăn đá tủ lạnh ở 0°C từ 1-2 giờ để chất lỏng dưới lamelle đóng băng → dùng lưỡi lam tách lamelle khỏi lame → đặt lame lần lượt vào các lọ cồn có nồng độ tăng dần để loại nước → dán mẫu bằng canada balsam pha trong xylen với tỉ lệ 1:1.

4) **Khảo sát độ bền màu.** Quan sát các tiêu bản sau khi cố định ở các thời điểm khác nhau: sau 1 tháng, 2 tháng, 3 tháng, 6 tháng, 12 tháng, 24 tháng.

* Khoa sư phạm Khoa học tự nhiên, Trường Đại học Sài Gòn

3. Kết quả và thảo luận

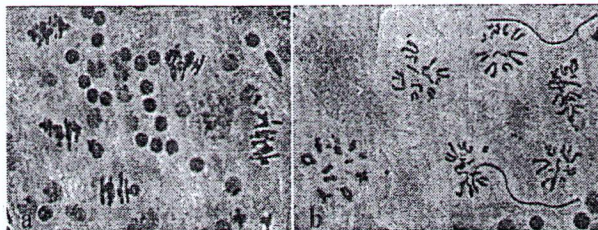
1) Thực hiện tiêu bản tạm thời

a) *Nhuộm tương TB*. Khi nhuộm tương TB với natri citrate 1% trong 5 phút, các TB tương lên nhưng chưa đủ để các NST dần trải nên khó quan sát hình thái và đếm số lượng NST. Nhuộm tương bằng natri citrat 0,4% trong 30 phút cho kết quả tốt nhất, hầu hết TB tương lên và các NST phân tán trong TB, có thể thấy rõ được hình thái và đếm được số lượng NST (xem bảng 1, hình 1).

Bảng 1. Kết quả khảo sát nồng độ natri citrate dùng để sắc nhuộm tương TB

Nồng độ natri citrate	0,2%	0,3%	0,4%	0,5%
Độ phân tán NST	++++	++++	++++	++
Hình dạng TB	B	B	A	C

Quy ước: Mức độ (++++)
ứng với 100% TB có bộ NST phân tán



(A: Hầu hết các TB tương lên đạt yêu cầu; B: TB bị vỡ, NST bị lác; C: TB chưa tương lên đúng mức)

Hình 1. TB sinh dục châu chấu nhuộm tương bằng natri citrate 1% (a) và natri citrate 0,4% (b)

b) *Cố định mẫu vật*. Cố định mẫu giúp làm ngừng quá trình phân bào mà không ảnh hưởng đến bộ NST. Có nhiều dung dịch được dùng để cố định như dung dịch Navasin, Carnoy. Dung dịch Carnoy được chọn để cố định vì nó đơn giản, an toàn và dễ kiếm. Nhằm chủ động mẫu vật và tiết kiệm thời gian, có thể cho túi tinh sau khi cố định vào cồn 70° và bảo quản trong tủ lạnh ở 0°C, các mẫu túi tinh này có thể sử dụng trong khoảng 1-2 năm.

c) *Nhuộm mẫu*. Hiện nay, có nhiều phẩm nhuộm dùng để nhuộm NST như hematoxylin, carmine, giemsa, orcein. Đối với TB động vật, nhuộm bằng orcein thường được sử dụng hơn. Kết quả thí nghiệm cho thấy, việc nhuộm mẫu bằng aceto-orcein 2% trong 30 phút cho kết quả tốt nhất, các NST bắt màu đậm, có độ tương phản cao với TB chất. Để tiết kiệm thời gian, có thể nhuộm mẫu trong điều kiện nhiệt độ là 60°C với nồng độ aceto-orcein là 2% trong thời gian 15 phút vẫn cho kết quả tốt.

Acid acetic giúp mẫu sáng hơn nhưng đồng thời cũng làm bay màu NST, vì thế chúng tôi chọn lên kính bằng một giọt nước vẫn cho kết quả tốt.

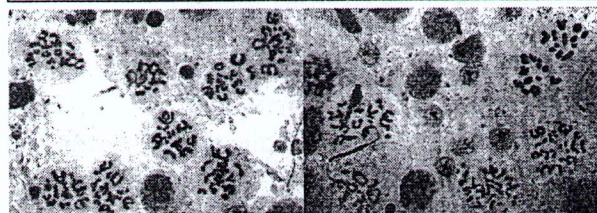
Bảng 2. Nồng độ aceto-orcein và thời gian nhuộm mẫu trong điều kiện nhiệt độ phòng

Dd nhuộm / Thời gian	aceto-orcein 1%	aceto-orcein 1,5%	aceto-orcein 2%
05 phút	+	+	+
10 phút	+	++	++
15 phút	++	++	+++
20 phút	++	+++	++++
25 phút	+++	+++	++++
30 phút	+++	++++	+++++

Bảng 3. Nồng độ aceto-orcein và thời gian nhuộm mẫu trong điều kiện 60°C

Quy ước: Số dấu (+) thể hiện độ bắt màu của nhiễm sắc thể

Dd nhuộm / Thời gian	aceto-orcein 1%	aceto-orcein 1,5%	aceto-orcein 2%
05 phút	+	+	++
10 phút	++	+++	++++
15 phút	++	+++	+++++
20 phút	+++	++++	+++++
25 phút	+++	++++	+++++
30 phút	+++	++++	+++++



Hình 2. Bộ NST ở châu chấu (*Oxya chinensis*) (X400)

2) Thực hiện tiêu bản cố định

a) *Tách lamelle*. Theo Vũ Đức Lưu, Nguyễn Minh Công (2007), ngâm tiêu bản tạm thời trong acid acetic khoảng 30 phút để lamelle tự động tách khỏi lame. Tuy nhiên, khi thực hiện theo phương pháp này, có thể mẫu vật bị xô dịch, không còn giữ đúng vị trí trên lame. Có thể đặt tiêu bản trên băng đá CO₂ trong tủ lạnh từ 12-24 giờ, tuy nhiên phương pháp này cần đòi hỏi phương tiện nhiều hơn nên chúng tôi chọn giải pháp đặt tiêu bản trong ngăn đá tủ lạnh ở 0°C từ 1-2 giờ, kết quả cho thấy khi tách lamelle, lượng mẫu còn bám trên lame khá nhiều.

Đối với tiêu bản TB động vật, nếu để quá lâu ở nhiệt độ dưới 0°C thì các TB có thể bị biến tính, ngược lại nếu để tiêu bản ở nhiệt độ dưới 0°C trong thời gian quá ngắn thì khả năng bám dính của mẫu trên lame giảm. Sau khi mẫu trên tiêu bản đã đóng băng, dùng lưới lam hoặc lưới dao mổ tách cẩn thận lamelle khỏi lame.

b) *Loại nước bằng cồn*. Có thể loại nước bằng cách để khô tự nhiên từ 1-2 ngày nhưng qua thực nghiệm, các tiêu bản không đồng nhất khi cố định, mẫu khô nhanh hoặc chậm tùy vào lượng nước khi lên kính. Ngoài ra, thuốc nhuộm bị oxy hóa nên màu sắc của NST bị biến đổi. Đối với cách loại nước bằng cồn, đặt lame đã được tách lamelle vào cồn có nồng độ tăng dần để loại nước khỏi TB. Thời gian ngâm mẫu trong các lọ cồn tùy theo các đối tượng khác nhau. Quá trình loại nước nếu không tốt sẽ dẫn đến trường hợp nước còn trong TB sẽ làm tiêu bản bị hư sau vài ngày, nếu loại nước quá nhanh thì TB sẽ nhanh chóng bị teo lại không quan sát được NST.

Qua khảo sát, thời gian loại nước ở các nồng độ cồn cho kết quả tốt nhất là: cồn 40° - 15 giây → 50° - 15 giây → 60° - 15 giây → 70° - 15 giây → 80° - 15 giây → 90° - 10 giây → cồn tuyệt đối - 5 giây.

Theo Võ Thị Thanh Phương (2012), cần dùng xylene hoặc n-butanol để loại nước hoặc làm sáng mẫu. Nhưng nếu sử dụng xylene không cẩn thận thì có thể gây độc cho người sử dụng. Qua thực nghiệm cho thấy có thể bỏ qua bước này mà kết quả vẫn không làm giảm màu sắc, độ tương phản và độ bền màu của tiêu bản.

c) *Dán mẫu*. Mẫu sau khi loại nước có thể dán bằng euparon hoặc baume canada pha trong xylene. Đề tài chọn canada balsam pha trong xylene với tỉ lệ 1:1 để dán tiêu bản đã cho kết quả tốt. Nhỏ 1 giọt canada balsam lên mẫu đã loại nước sau đó đẩy lamelle lại và để khô tự nhiên sau vài ngày.

3) *Khảo sát độ bền màu*. Quan sát tiêu bản cố định được thực hiện vào tháng 03/2012 đến 02/2014 vẫn có độ bền màu tốt.



Hình 3. Hình ảnh NST ở châu chấu (*Oxya chinensis*) (X1.000)

a. Kì đầu I b. Kì giữa I c-d. Kì giữa II e-f. Kì sau II

* * *

Đề tài đã đề xuất được quy trình thực hiện tiêu bản hiển vi tạm thời và cố định, trong đó có thể quan sát rõ hình thái và số lượng NST. Nồng độ nhược trương thích hợp nhất là natri citrate 0,4% trong 30 phút, giúp NST phân tán đều trong TB. Nhuộm NST bằng aceto-

orcein 2% trong 15 phút ở 60°C hoặc 30 phút ở nhiệt độ phòng cho kết quả tốt. Để tiêu bản trong ngăn đá tủ lạnh từ 1-2 giờ sẽ giúp tách rời lamelle khỏi lame dễ dàng mà không làm xê dịch mẫu. Tiêu bản cố định vẫn đạt yêu cầu khi lược bỏ công đoạn loại nước bằng xylene hoặc n-butanol. Dán mẫu bằng canada balsam pha với xylene theo tỉ lệ 1:1. □

Tài liệu tham khảo

1. Huỳnh Thị Ngọc Nhân - Kiều Ngọc Ân - Mai Thị Tuyết. **Thực tập di truyền cơ sở**. NXB Đại học quốc gia TP. Hồ Chí Minh, 2004.
2. Lê Đình Trung - Đặng Hữu Lan. **Di truyền học**. NXB Giáo dục, H. 2000.
3. Nguyễn Nghĩa Thìn. **Thực vật có hoa**. NXB Đại học quốc gia, H. 2006.
4. Trần Tú Ngà. **Giáo trình thực tập di truyền và chọn giống**. NXB Nông nghiệp, H. 1982.
5. Võ Thị Thanh Phương. “Khảo sát số lượng nhiễm sắc ở tế bào thực vật và tế bào động vật bằng phương pháp xử lí sốc nhược trương”. Tạp chí *Khoa học Đại học Cần Thơ*, 2012, số 21; tr. 198-208.
6. Vũ Đức Lưu - Nguyễn Minh Công. **Giáo trình Di truyền học**. NXB Đại học sư phạm, H. 2007.

SUMMARY

Based on the procedures performed microscope slide in grasshopper meiosis, the author improved a number of actions to create the template serves morphological observation and counting the number of chromosomes of the male grasshopper. It can be used as a reference for teachers and students to contribute additional sources of fixed specimens to enhance the teaching quality of genetics exercises in schools.

Phân tích đề thi trắc nghiệm...

(Tiếp theo trang 47)

bằng lí thuyết đáp ứng câu hỏi”. Tạp chí *Nghiên cứu y học*, số 68/2010, tr.130-137.

4. Nguyễn Bảo Hoàng Thanh. “Sử dụng phần mềm Quest để phân tích câu hỏi trắc nghiệm khách quan”. Tạp chí *Khoa học và công nghệ Đại học Đà Nẵng*, số 2/2008, tr. 119-126.

SUMMARY

This paper presents the results of the analysis of a Sixth Grade Biology objective test with the support of VITESTA software. This software evaluating the quality of questions and objective tests in the interaction with the student's competency based on Item Response Theory.