

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 bào 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 đồng 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:

– Dễ 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 $23 - 25^{\circ}\text{C}$ 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 có thể 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 $23 - 25^{\circ}\text{C}$ 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 — 2 cm; còn ở rễ hành tây 1,2 — 1,5 cm và ở lúa nước là: 0,8 — 1 cm (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 Knop 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 ẩm 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 đầy 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 Navagin, 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, clorofom, 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 lý 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 thẩm 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 ẩm 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. Dung 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 kém, các mép xung quanh rễ sẽ bị tưa 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. Tẩm 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 clorofooc, 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
Clorofooc	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 đục 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 $1,5 \times 2 \times 2,5$ cm. 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.