

ĐẠI HỌC CÔNG NGHIỆP THÀNH PHỐ HỒ CHÍ MINH
TRUNG TÂM THỰC HÀNH CÔNG NGHỆ THỰC PHẨM
SINH HỌC – MÔI TRƯỜNG

Bộ môn Công nghệ Sinh học

Giáo trình

THỰC TẬP SINH HỌC ĐỘNG VẬT

Dành cho Sinh viên chuyên ngành Sinh học và Công nghệ Sinh học

Biên Soạn

QUAN QUỐC ĐĂNG

LƯU HÀNH NỘI BỘ

Tp. Hồ Chí Minh - 2005

PHƯƠNG PHÁP NHUỘM TIÊU BẢN MÁU VÀ PHÂN BIỆT CÁC LOẠI TẾ BÀO MÁU

I. ĐẠI CƯƠNG

A. Một số đặc điểm sinh lý của bạch cầu

Số lượng tế bào bạch cầu ở người trưởng thành thông thường có từ 5.000 đến 10.000 tb/mm³ máu và chỉ chiếm trung bình 1% tổng số tế bào máu.

Ở cơ thể người và động vật bậc cao, các tế bào bạch cầu có một vai trò quan trọng trong cơ chế chống kháng nguyên, bảo vệ cơ thể, ví dụ thực bào, sinh tổng hợp kháng thể (Ig), sản xuất interferon... Trong các tình trạng bệnh lý, số lượng bạch cầu biến động dẫn đến tỷ lệ tế bào cũng thay đổi. Dựa trên cơ sở ấy, người ta thường lấy số lượng và tỷ lệ các loại tế bào bạch cầu máu ngoại vi ở người để chẩn đoán hiện trạng sinh lý, bệnh lý của cơ thể.

Bạch cầu là những tế bào có nhân, có khả năng di động, hình dạng và kích thước có thể biến đổi tùy từng loại bạch cầu. Bạch cầu được chia làm hai loại: bạch cầu không hạt và bạch cầu có hạt căn cứ theo sự bắt màu của các hạt ở nguyên sinh chất của chúng. Sự bắt màu của các hạt nguyên sinh chất có thể khác nhau khi tế bào được nhuộm với các loại thuốc nhuộm khác nhau.

B. Phân loại bạch cầu

1. Bạch cầu không hạt

Các tế bào này không có các hạt bắt màu ở nguyên sinh chất, chúng bao gồm các dòng Lymphocyte và Monocyte.

a. Bạch cầu Lymphocyte

Trong dòng này có hai loại tế bào là Lymphocyte B (Bursa fabricius) và Lymphocyte T (Thymus). Điển hình của dòng này là tế bào có hình tròn, nhân hình cầu, nguyên sinh chất hẹp, ưa kiềm, chung quanh nhân có viền sáng.

Lymphocyte to có kích thước 6-10 μ m, nhân tròn bắt màu tím xanh, nhiễm sắc thô, nguyên sinh chất bắt màu xanh da trời, có viền xanh thẩm ngoại vi. Lymphocyte nhỏ có kích thước 5-9 μ m, nhân tròn, nhiễm sắc thô, bắt màu tím sẫm, chiếm 9/10 thể tích tế bào. Nguyên sinh chất của tế bào ưa bazơ mạnh, do vậy khi nhuộm bắt màu xanh.

b. Bạch cầu Monocyte

Là những tế bào lớn, có kích thước 20 – 25 μ m. Dòng này là các tế bào hình tròn, nguyên sinh chất bắt màu xanh, không có hạt, nhân hình bầu dục, hạt đậu, bắt màu tím đen. Các tế bào này có khả năng thực bào.

2. Bạch cầu có hạt

Là những bạch cầu mà trong nguyên sinh chất của chúng có hạt, dựa vào sự bắt màu của các hạt này, người ta chia ra làm 3 loại tế bào khác nhau.

a. Bạch cầu trung tính (neutrophil)

Kích thước 10-15 μ m, nhân thắt eo, phân chia thành các thùy, nguyên sinh chất có hạt tròn khoảng 0,2-0,4 μ m có màu hồng xanh tím. Các hạt này có chứa este của acid hyaluronic là thành phần quan trọng của glycogen (đường động vật), lượng este này tăng song song với lượng glycogen của gan. Các tế bào này có khả năng thực bào.

b. Bạch cầu ưa acid (eosinophil)

Kích thước 10-15 μ m, nhân thắt eo, chia thùy. Nguyên sinh chất có hạt to, tròn đều khoảng 1 μ m, hạt ưa acid bắt màu da cam. Bản chất hạt acid là chứa nhiều histon, một số tác giả còn cho rằng có chứa histamine và acetylcholin cao, pH rất acid (khoảng 2).

c. Bạch cầu ưa bazơ (basophil)

Kích thước 10-15 μ m, nhân thắt eo, chia đoạn. Nguyên sinh chất có hạt màu xanh methylen hoặc xanh toluidin, nhuộm bắt màu xanh thẩm, hạt rất to khoảng 1-2 μ m và phân bố không đều trong nguyên sinh chất.

C. Số lượng và công thức bạch cầu

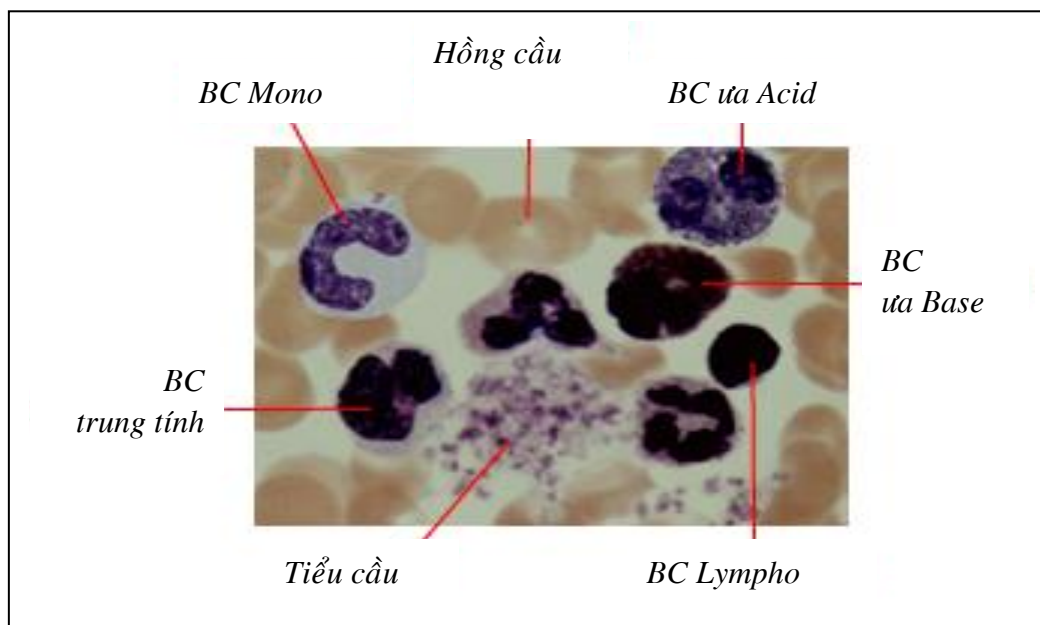
Bằng phương pháp sử dụng các tiêu bản cố định máu ngoại vi được dàn mỏng và nhuộm, người ta dựa vào hình dáng, kích thước, màu của nhân tế bào, màu của các hạt nguyên sinh chất trong bào tương, vừa phân loại

vừa đếm ngẫu nhiên sao cho ít nhất có 100 tế bào. Từ đó xác định công thức bạch cầu (muốn có độ chính xác cao, có thể sử dụng nhiều lame kính cố định máu để có nhiều mẫu, qua đó thu được nhiều số liệu hơn).

Số lượng bạch cầu ở người trưởng thành bình thường trung bình:

Nam: 7000-9000 tb/mm³ máu ngoại vi.

Nữ: 6000-8000 tb/mm³ máu ngoại vi.



Hình 1.1. Các loại tế bào máu trên tiêu bản đã nhuộm

Ở trẻ em và phụ nữ có thai thì số lượng bạch cầu cao hơn. Số lượng bạch cầu tăng trong các bệnh nhiễm khuẩn cấp tính, đặc biệt tăng cao trong các bệnh bạch huyết cấp hoặc mãn tính. Số lượng bạch cầu giảm trong trường hợp nhiễm độc, nhiễm xạ, nhiễm khuẩn, bệnh suy tủy, kể cả một số trường hợp stress...

D. Một số chỉ thị bệnh lý ở người

Sự thay đổi công thức bạch cầu có nhiều ý nghĩa quan trọng trong chẩn đoán bệnh lý ở người, ví dụ:

- Bạch cầu trung tính tăng trong các trường hợp nhiễm trùng cấp, nhiễm nấm, nhiễm siêu vi, nhiễm ký sinh trùng, viêm, xuất huyết cấp, tiêu huyết, bệnh ác tính: ngộ độc thuốc Digitat, Corticoid, nọc rắn... ; bạch cầu trung tính

giảm trong trường hợp nhiễm kim loại nặng như Pb, Ar, suy tủy, nhiễm virus (quai bị, sởi...).

- Bạch cầu ưa acid tăng trong trường hợp dị ứng, bệnh ký sinh trùng, bệnh ngoài da..., trong khi đó chúng giảm số lượng trong các trường hợp bị kích động, chấn thương tâm lý, dùng thuốc ACTH (adrenocorticotropin), Cortisol...

- Bạch cầu ưa bazơ tăng trong bệnh cầu tủy, dị ứng, nhiễm phóng xạ, truyền nhiều huyết thanh... , giảm khi dị ứng cấp, dùng ACTH, Thyrocin epinephrin.

- Bạch cầu Monocyte tăng trong trường hợp bệnh có tổn thương ở hệ thống võng nội mạc, bệnh Lypus, viêm khớp, nhiễm ký sinh trùng sốt rét...

- Ngoài sự thay đổi công thức bạch cầu trong các trường hợp bệnh lý, còn có sự thay đổi về hình dạng, kích thước bạch cầu trong một số bệnh.

E. Xác định hồng cầu mạng lưới

Hồng cầu mạng lưới là loại hồng cầu mới từ tủy xương ra máu ngoại vi, mạng lưới đó là mạng nội bào tương bắt màu kiềm chưa bị tiêu hết. Sau 24 giờ máu ra ngoại vi, mạng lưới tiêu biến, hồng cầu mạng lưới trở thành hồng cầu trưởng thành, bào tương chỉ còn có huyết cầu tố.

Nhuộm hồng cầu mạng lưới bằng phương pháp nhuộm sống, sau đó đếm số lượng của chúng trên 1000 hồng cầu và tính tỷ lệ phần trăm

Ở người bình thường tỷ lệ hồng cầu lưới trong máu ngoại vi là:

Nam: $0,7 \pm 0,21\%$

Nữ: $0,9 \pm 0,25\%$

II. CHUẨN BỊ

a. Dụng cụ- thiết bị

- Đèn cồn.
- Kim chích máu.
- Kính hiển vi (thị kính 15 hoặc 10, vật kính 90 hoặc 100).
- Máy đếm tế bào (loại có nút bấm).
- Tủ sấy.
- Lame.
- Giá để lame.

- Lamelle.
- Bông thấm.
- Ống hút 1cc.

b. Hóa chất

- Dầu cèdre (dầu bá hương).
- Dầu Xylène.
- Cồn 95⁰ - 99⁰(Methylic).
- Ether (tác dụng giảm đau).
- Dung dịch thuốc nhuộm Giemsa

Công thức dung dịch Giemsa:

* Giemsa: 7,6g.

* Cồn methylic: 750ml.

* Glycerine: 250ml.

- Dung dịch chống đông Citrat natri 5% (có thể sử dụng dung dịch heparin).
- Nước cất trung tính.
- Dung dịch nhuộm xanh Cresyl gồm: 1g xanh cresyl ánh, 100ml cồn tuyệt đối.

c. Mẫu vật

- Chuột nhắt trắng (để lấy máu).
- Mẫu máu người (máu tươi hoặc có thể sử dụng máu ngoại vi đã nhuộm sẵn tại phòng thí nghiệm).

III. THỰC HÀNH

Có nhiều phương pháp nhuộm và loại thuốc nhuộm được khác nhau, bài thực tập này sử dụng phương pháp nhuộm đơn với thuốc nhuộm Giemsa.

Mẫu máu có thể sử dụng từ hai nguồn: sinh viên tự lấy máu của bản thân từ đầu ngón tay hoặc từ mẫu máu có sẵn đã được xử lý tại phòng thí nghiệm.

1. Xác định bạch cầu

a. Lấy mẫu máu

- Trường hợp sử dụng máu ở đầu ngón tay: chuẩn bị 2 miếng lame sạch (1 và 2).

Vẩy nhẹ cả bàn tay trái, sau đó vuốt nhiều lần từ cổ tay xuống tới đầu ngón tay cho máu dồn xuống. Dùng bông gòn và cồn 95^0 khử trùng kim chích và khử trùng các đầu ngón tay (thông thường máu được lấy từ đầu ngón tay thứ ba hoặc ngón áp út). Dùng ngón tay cái làm căng da của đầu ngón tay định lấy máu, tay phải cầm kim có tẩm ether chích vào đầu ngón tay đó một vết sâu khoảng 1 - 2mm, bóp nhẹ cho ra một giọt máu. Bỏ giọt máu đầu, lấy giọt máu thứ hai chấm nhẹ lên vị trí cuối lame 1.

Cần thao tác nhanh để tránh bị đông máu.

- *Trường hợp sử dụng máu đã chống đông có sẵn:* Nhỏ một giọt máu chống đông lên lame 1 ở vị trí cuối lame.

b. Dàn mỏng mẫu máu

Lấy lame 2 chạm vào giọt máu với góc $30 - 45^0$, để giọt máu lan theo cạnh lame kính rồi kéo lame 2 từ đầu này sang đầu kia nhưng vẫn giữ nguyên góc 45^0 , như vậy là đã dàn đều giọt máu thành lớp mỏng trên lame 1. Chú ý khi dàn máu đẩy lame 2 với tốc độ vừa phải, nếu đẩy lame 2 quá nhanh máu sẽ dàn không đều, ngược lại nếu đẩy quá chậm, lớp máu sẽ quá dày, khó đếm. Để tiêu bản máu khô (lame 1) tự nhiên (có thể dùng gió, tủ ấm hoặc hơi nhẹ lửa).

c. Cố định tiêu bản

Sử dụng cồn methylic nhỏ bao đều trên tiêu bản máu sau đó để đứng tiêu bản trên giá cho alcohol chảy hết và để tiêu bản khô tự nhiên.

d. Nhuộm tiêu bản

- Tiêu bản máu đã cố định bằng cồn được ngâm trong dung dịch Giemsa (2ml Giemsa pha với 18ml nước cất, lắc đều) trong 15 - 20 phút (có thể nhỏ dung dịch Giemsa phủ đều trên mẫu máu của tiêu bản đã cố định khi ta không dùng cốc ngâm lame). Gác các lame mẫu lên các thanh thủy tinh nằm ngang, tránh để hóa chất chạm tay người làm.

- Đem tiêu bản rửa bằng nước cất (không để nước chảy thẳng vào chỗ có tiêu bản máu).

- Để khô tự nhiên (hoặc sấy khô nhẹ trong tủ ấm hay trên ngọn đèn cồn).