

NGHIÊN CỨU MỘT SỐ YẾU TỐ ẢNH HƯỞNG ĐẾN QUÁ TRÌNH THU VÀ SỬ DỤNG PHÔI CÁ NGỰA VẼN TRONG ĐẠY VÀ HỌC THỰC HÀNH HỌC PHẦN TẾ BÀO HỌC VÀ SINH HỌC PHÁT TRIỂN

Đào Thị Sen¹, Chu Thị Thu Ngọc¹ và Mai Văn Hưng²

¹*Khoa Sinh học, Trường Đại học Sư phạm Hà Nội*

²*Trường Đại học Giáo dục, Đại học Quốc gia Hà Nội*

Tóm tắt. Cá ngựa vằn (*Danio rerio*) thuộc bộ Cá chép (Cypriniformes), họ Cá chép (Cyprinidae) là loài động vật mô hình sử dụng quan sát quá trình phát triển phôi và hiện được sử dụng nhiều trong các nghiên cứu về ảnh hưởng của một số chất lên quá trình phát triển phôi, nghiên cứu bệnh tật và y sinh học người. Nghiên cứu này đã tiến hành nghiên cứu một số yếu tố ảnh hưởng đến quá trình thu phôi và nghiên cứu sử dụng phôi cá trong thực hành tế bào học và sinh học phát triển. Kết quả cho thấy ở điều kiện nuôi nhốt trong bể thí nghiệm nhỏ, thời gian cá giao phối hiệu quả nhằm thu phôi khoảng 45 phút với hiệu suất thụ tinh đạt 89,5%, số trứng được sinh ra khoảng 126 trứng/con/lần, số trứng được thụ tinh khoảng 113 trứng/con/lần. Thời gian phát triển phôi cá nhanh, các mốc thời gian ít biến động thích hợp sử dụng làm mẫu để thiết kế một số thí nghiệm thực hành về chu kỳ tế bào và phôi sinh học mô tả; sử dụng phôi cá làm tiêu bản ép quan sát nguyên phân phôi bào cá cần thủy phân phôi cá trong HCl 1N ở 60°C trong 10 phút, nhuộm bằng orcein 1,25% trong 20 phút và bổ sung 1 giọt acid acetic 45% khi ép mẫu.

Từ khóa: Cá ngựa vằn, nguyên phân, phôi sớm, tế bào học, sinh học phát triển.

1. Mở đầu

Cá ngựa vằn (*Danio rerio*) là một trong những đối tượng thích hợp cho quan sát quá trình phát triển ở động vật [1]. Từ những năm 1980, loài cá này bắt đầu được sử dụng làm sinh vật mô hình trong các nghiên cứu tại Đại học Oregon, Hoa Kỳ [2]. Đến nay, cá ngựa vằn đã dần khẳng định được ưu thế sinh vật mô hình của mình khi chúng ngày càng được sử dụng nhiều trong các nghiên cứu về ảnh hưởng của một số chất lên quá trình phát triển phôi [3-5], nghiên cứu bệnh tật và y sinh học người và rất nhiều các nghiên cứu khác [5-8]. Cá ngựa vằn có nhiều đặc điểm ưu việt để sử dụng làm sinh vật mô hình: Thời gian trưởng thành sinh dục ngắn (khoảng 3 tháng), số lượng trứng trong một lần sinh lớn (100 - 200 trứng), trứng rời, kích thước trứng khá lớn (0,6 - 0,7 mm), thụ tinh ngoài, quá trình phát triển phôi diễn ra nhanh chóng, vỏ trứng trong suốt nên có thể dễ dàng quan sát các giai đoạn phát triển phôi [1].

Ở nước ta, hiện đã có một số nghiên cứu tiến hành trên cá ngựa vằn như sử dụng phôi cá để đánh giá độc tính, một vài nghiên cứu xây dựng quy trình làm tiêu bản quan sát phân bào nguyên phân ở phôi cá ngựa vằn (*Danio rerio*) [9-11] kết quả quan sát được các kì phân bào nguyên phân.

Ngày nhận bài: 6/11/2018. Ngày sửa bài: 5/3/2019. Ngày nhận đăng: 12/3/2019.

Tác giả liên hệ: Đào Thị Sen. Địa chỉ e-mail: sen.hnue@gmail.com

Tế bào học và Sinh học phát triển là học phần có ý nghĩa quan trọng trong chương trình đào tạo sinh viên chuyên ngành Sinh học tại các trường đại học, cao đẳng trong cả nước và đây cũng là phần kiến thức cơ bản trong chương trình Sinh học cấp học THCS và THPT. Thực tế giảng dạy hiện nay tại khoa Sinh học của các trường Sư phạm, các nội dung thực hành của nhóm kiến thức về tế bào học và sinh học phát triển vẫn chưa thực sự mang tính bao quát và đầy đủ. Điển hình như ở phần tế bào học, các thí nghiệm về chu kỳ tế bào và hoạt động của NST trong nguyên phân mới chỉ được tiến hành trên đối tượng thực vật, phần Sinh học phát triển cá thể động vật vẫn chưa có các nội dung thực hành phù hợp [12, 13]. Các khó khăn trong việc lựa chọn, nuôi dưỡng sinh vật mô hình tại phòng thí nghiệm thực hành, thu thập và bảo quản mẫu vật, thời gian áp dụng cho tiết học, kinh phí,... khiến cho việc sử dụng đối tượng động vật trong các bài thực hành còn nhiều hạn chế. Vì vậy, việc xác định đối tượng động vật mô hình, nghiên cứu khảo sát điều kiện nuôi dưỡng phù hợp với cơ sở vật chất hiện có tại phòng thí nghiệm, đơn giản hóa quy trình chuẩn bị nhằm tăng hiệu quả học tập và khả năng áp dụng trong giảng dạy thực hành Tế bào học và Sinh học phát triển là việc làm hết sức cần thiết.

2. Nội dung nghiên cứu

2.1. Vật liệu và phương pháp nghiên cứu

*** Vật liệu**

Cá ngựa vằn (*Danio rerio*) thuộc bộ Cá chép (Cypriniformes), họ Cá chép (Cyprinidae). Trong nghiên cứu này chúng tôi sử dụng cá ngựa vằn khoảng hai tháng tuổi, có kích thước trung bình khoảng 2 - 2,5 cm, giống cá ngựa vằn màu cam, thân cá có 4 sọc trắng chạy dọc từ sau khoang mang về phía đuôi.

*** Phương pháp bố trí thí nghiệm**

Nuôi cá: cá được nuôi tại phòng thí nghiệm trong điều kiện bình thường: nhiệt độ phòng thường; ánh sáng theo chu kỳ ngày đêm, thay nước 3 - 4 ngày/lần, sục khí nhẹ, cho ăn lòng đỏ trứng sậy khô nghiền nhỏ, thức ăn tổng hợp, rong tảo, cho ăn 2 lần/ngày. Các bể nuôi có kích thước: 500 × 370 × 340 (mm); mật độ cá thể 10 cá thể/bể.

Ghép phôi cá bố mẹ: Tách riêng cá bố mẹ cho tới khi ghép phôi, cho cá bố mẹ ở điều kiện 14 giờ sáng - 10 giờ tối, kích thước bể ghép phôi: 280 × 180 × 150 (mm), cho cá giao phối vào đầu chu kỳ sáng (7h30 hoặc 8h sáng), lựa chọn cá bố mẹ khỏe mạnh, con cái bụng to, con đực có kích thước khoảng 3 cm, ghép phôi 1 cặp cá bố mẹ/lần. Tiến hành ghép phôi cá ở các dải nhiệt độ: dưới 15°C, 15 - 23°C, 23 - 32°C; trong các khoảng thời gian: 20 phút, 30 phút, 45 phút. Chỉ tiêu theo dõi: số lần thu được trứng cá, số lượng trứng, số lượng trứng được thụ tinh.

*** Phương pháp thu và bảo quản mẫu**

Thời điểm thu mẫu: sau ghép phôi 15 phút, 30 phút, 45 phút, 60 phút, 75 phút, 90 phút, 105 phút, 120 phút, 135 phút, 150 phút, 165 phút, 180 phút, 4 giờ, 5 giờ, 6 giờ, 12 giờ, 24 giờ, 48 giờ, 52 giờ. Cố định mẫu bằng dung dịch Carnoy II trong 2 - 12 giờ, bảo quản trong cồn 70° ở 4 - 8°C [9, 14].

*** Phương pháp xác định và phân loại các giai đoạn phát triển phôi**

Tiến hành phân loại các giai đoạn phát triển phôi bằng kính hiển vi quang học Olympus CX 21 ở vật kính 4X, 10X, chụp ảnh, phân loại, lưu và bảo quản mẫu các giai đoạn phát triển bình thường của phôi trong cồn 70° ở 4 - 8°C.

*** Phương pháp làm tiêu bản tạm thời**

Phôi cá ngựa vằn được thu mẫu, cố định trong Carnoy II trong 2 - 12 giờ, bảo quản ở 4 - 8°C, trước khi làm tiêu bản đưa mẫu vật ra nhiệt độ thường khoảng 15 - 20 phút. Sử dụng phương pháp làm tiêu bản ép của Nguyễn Xuân Việt (2016) [14]. Sử dụng phương pháp tách phôi thu tế bào

của Trương Thị Nhân (2017) [9]. Nghiên cứu xây dựng quy trình làm tiêu bản ép trên đối tượng phôi cá ngựa vằn bằng cách xác định một số nội dung sau:

Nghiên cứu thời gian thủy phân thích hợp: Thủy phân trứng cá trong HCl 1N, ở 60°C trong 5 phút hoặc 10 phút, nhuộm trứng trong orcein 1,25%. Tách phôi, ép tiêu bản và quan sát mức độ bắt màu của thuốc nhuộm. Đối chứng với phôi nhuộm không qua thủy phân. Chỉ tiêu theo dõi: Mức độ bắt màu của NST, tế bào chất và chất lượng tiêu bản.

Xác định thời gian nhuộm mẫu: Nhuộm trứng vào dung dịch orcein 1,25% trong 10, 20, 30, 45 và 60 phút. Chỉ tiêu theo dõi: Mức độ bắt màu của NST, tế bào chất và chất lượng tiêu bản.

*** Phương pháp xử lý số liệu**

Số liệu thu được trong nghiên cứu được xử lý theo phương pháp thống kê sinh học và sử dụng chương trình Microsoft Excel.

2.2. Kết quả và thảo luận

2.2.1. Điều kiện ghép phôi cá bố mẹ

Mục đích nghiên cứu là nuôi cá thu phôi để sử dụng cho các thí nghiệm sử dụng phôi cá nên giai đoạn ghép phôi cá đặc biệt chú ý. Trong quá trình ghép phôi cần chú ý tới bề ghép phôi và điều kiện ghép phôi. Bể ghép được thiết kế thêm một tấm lưới chắn cách đáy 1,5 - 2 cm để trứng lọt xuống đáy bể, tránh cá bố mẹ ăn trứng. Một ngày trước khi ghép phôi đưa cá bố mẹ vào bể ghép phôi, ngăn riêng cá bố mẹ bằng một tấm lưới mỏng. Đảm bảo điều kiện 14 giờ sáng/10 giờ tối giúp kích thích cá đẻ trứng. Cá ngựa vằn trong tự nhiên sinh sản theo mùa, mùa sinh sản của cá trùng với mùa mưa hàng năm. Tuy nhiên, trong điều kiện được đảm bảo về thức ăn, điều kiện sống phù hợp, cá có thể sinh sản quanh năm [1, 2].

Bảng 1. Ảnh hưởng của thời gian giao phối đến chất lượng thụ tinh

Thời gian	Số lượng trứng	Số lượng trứng được thụ tinh	Hiệu suất thụ tinh (%)
20 phút	52,3 ± 9,3	26,7 ± 2,1	51,7 ± 6,8
30 phút	85,3 ± 5,0	59,3 ± 1,5	69,6 ± 2,5
45 phút	126 ± 3,6	112,7 ± 3,8	89,5 ± 5,0

Ghi chú: Số liệu thể hiện giá trị trung bình lặp lại 3 lần ± SD

Từ Bảng 1 ta thấy, khoảng thời gian ghép phôi cũng ảnh hưởng tới số lượng trứng và chất lượng thụ tinh. Dựa theo kết quả thực nghiệm có thể thấy rằng thời gian ghép phôi quyết định số lượng trứng và hiệu suất thụ tinh. Nếu thời gian ghép phôi quá ngắn, lượng trứng sinh ra ít, thời gian tiếp xúc giữa tinh trùng và trứng ít, hiệu suất thụ tinh không cao. Nếu thời gian ghép phôi quá dài sẽ ảnh hưởng tới thời điểm thu mẫu thích hợp. Trong thí nghiệm trên nhận thấy, thời gian ghép phôi 45 phút đạt số lượng trứng lớn và hiệu suất thụ tinh cao gần 90%. Tiếp tục thử nghiệm ghép phôi đến 60 phút song kết quả ít biến động so với 45 phút. Có thể thấy thời gian ghép phôi khoảng 45 - 60 phút là hợp lý. Đây là khoảng thời gian giúp cá đẻ số lượng trứng đủ lớn để tiến hành thu mẫu, ngoài ra sau khi thụ tinh 45 phút trứng sẽ chuyển sang quá trình phân cắt [1], nếu muốn đạt hiệu quả thu mẫu lớn nhất thì chỉ nên cho cá ghép phôi khoảng 45 phút.

Bảng 2. Ảnh hưởng của nhiệt độ đến khả năng ghép phôi của cá bố mẹ

Nhiệt độ	Số lần ghép phôi	Số lần thành công
Dưới 15°C	4	0
16°C - 23°C	8	3
23°C - 32°C	6	5

Nhiệt độ ảnh hưởng đến khả năng ghép phôi của cá. Nhiệt độ cũng ảnh hưởng rất lớn đến quá trình rụng trứng. Trong mùa đẻ trứng, nếu nhiệt độ quá thấp thì mặc dù tuyến sinh dục đã đạt đến thời kỳ cuối của giai đoạn IV và tuyến não thùy đã tích lũy đầy đủ kích dục tố nhưng trứng vẫn không rụng, phải đợi đến lúc nhiệt độ tăng đến một lượng thích hợp thì mới bắt đầu rụng trứng. Trong sinh sản nhân tạo, nhiệt độ thấp thường kéo dài thời gian hiệu ứng để gây rụng trứng. Nhiệt độ không thích hợp còn ảnh hưởng đến sự thụ tinh và phát triển phôi. Thực tế, cá ngựa vằn sống ở khu vực nhiệt đới, sinh sản chủ yếu vào các tháng mùa mưa. Đây là những tháng có nhiệt độ ổn định khoảng trên 20°C. Một số nghiên cứu có chỉ ra rằng, thời điểm ghép phôi cá bố mẹ thích hợp là khoảng 8 giờ sáng của những ngày âm áp [9]. Nghiên cứu này chỉ ra điều kiện nhiệt độ khi ghép phôi nên đạt khoảng 23 - 32°C và khoảng thời gian ghép phôi phù hợp khoảng 45 phút sẽ giúp tăng chất lượng ghép phôi cá bố mẹ.

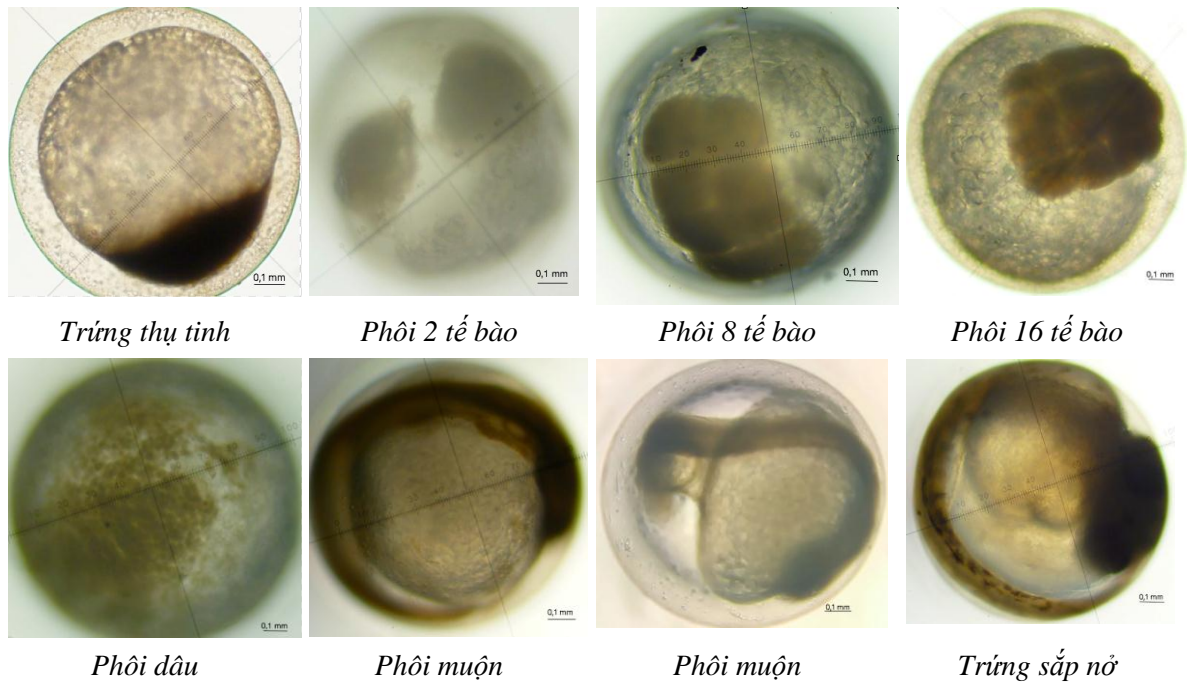
2.2.2. Xác định một số giai đoạn trong quá trình phát triển phôi ở cá ngựa vằn

Trong học phần Sinh học phát triển, giai đoạn phát triển phôi sớm đặc biệt quan trọng. Việc quan sát trên các đối tượng là nội dung chính của phôi sinh học mô tả, qua đó giúp hình thành năng lực quan sát, phân tích, so sánh, nghiên cứu khoa học của người học. Cá là một đối tượng đặc biệt quan trọng, đặc trưng cho trứng đoạn noãn hoàng và phân cắt hình đĩa [13]. Đồng thời, phôi cá cũng là một đối tượng mô hình cho việc nghiên cứu các chất ảnh hưởng đến phát triển động vật [3, 10]. Chính vì vậy, xác định được các thời điểm thu phôi và hình thái bình thường của phôi là cần thiết. Nghiên cứu đã tiến hành thu mẫu, xác định các thời điểm phát triển và hình thái bình thường của phôi cá. Nghiên cứu nhằm tạo bộ mẫu vật cố định có thể sử dụng trong các bài thực hành sinh học phát triển. Nghiên cứu đã thống kê được một số mốc thời gian phát triển phôi, dựa vào bảng thống kê này có thể xác định thời gian thu phôi phù hợp để chuẩn bị mẫu vật cho các thí nghiệm.

Bảng 3. Thời điểm thu phôi và giai đoạn phát triển thu được

Thời gian	Số lượng tế bào tạo ra	Đặc điểm của phôi
Thấy trứng - 45 phút	1	
45 phút - 60 phút	2	
60 phút - 1 giờ 15 phút	4	
1 giờ 15 phút - 1 giờ 30 phút	8	
1 giờ 30 phút - 1 giờ 45 phút	16	
Sau 3 giờ		Kết thúc giai đoạn phôi dẫu, bắt đầu chuyển sang phôi nang hoá
Sau 6 giờ		Khối tế bào lan phủ dần khắp bề mặt trứng
Sau 24 giờ		Quan sát rõ các bộ phận của phôi cá
Sau 51 giờ		Cá con nở

Bảng 3 cho thấy một số mốc thời gian cần lưu ý trong quá trình thu phôi. Thời điểm sau khi thụ tinh khoảng 45 phút, hợp tử sẽ bước vào giai đoạn phân cắt, sau đó cứ khoảng 15 phút sẽ diễn ra một lần phân chia tế bào của giai đoạn phân cắt sớm. Thời điểm sau thụ tinh khoảng 2,5 - 3 giờ là lúc thích hợp để thu phôi làm mẫu vật quan sát quá trình nguyên phân ở tế bào động vật bởi lúc này số lượng tế bào phôi khá lớn, các tế bào trở về kích thước bình thường, quá trình nguyên phân vẫn đang diễn ra nên rất thuận lợi quan sát các kì phân bào. 24 giờ sau thụ tinh, các bộ phận của một phôi đã hoàn chỉnh và cá con sẽ nở ra sau khoảng 51 giờ. Dựa vào bảng thống kê trên sẽ xác định được những thời điểm thu phôi phù hợp theo mục đích sử dụng.



Hình 1. Một số giai đoạn phát triển phôi ở cá ngựa vằn

2.2.3. Tối ưu một số yếu tố làm tiêu bản ép quan sát nguyên phân ở tế bào phôi cá

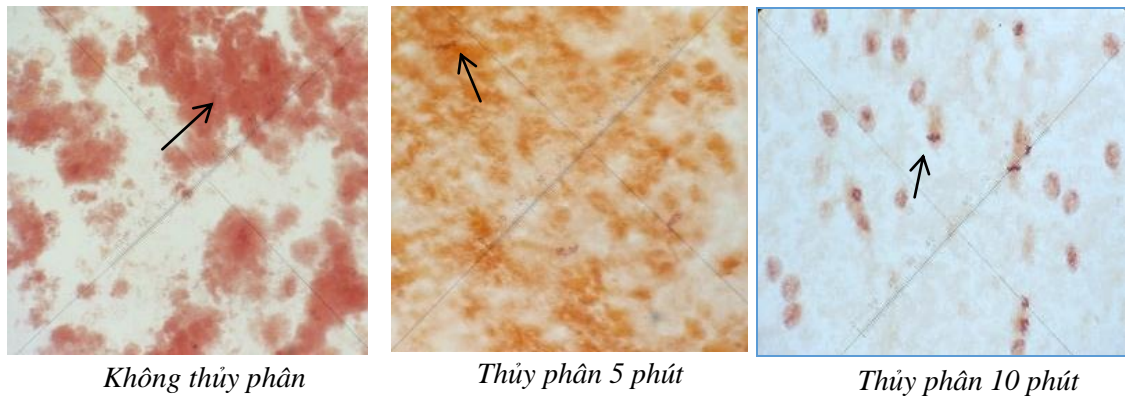
Một số nghiên cứu trước đã chỉ ra rằng orcein là loại thuốc nhuộm phù hợp cho nhuộm quan sát nhiễm sắc thể (NST) ở phôi bào cá bởi khả năng bắt màu cũng như tương đối đơn giản, chi phí không cao [9]. Trong nghiên cứu này bước đầu chúng tôi đã khảo sát với các nồng độ thuốc nhuộm orcein cho thấy nồng độ orcein 1,25% phôi cá vẫn bắt màu tốt. Vì thế, chúng tôi đã tiến hành sử dụng orcein 1,25% cho các nghiên cứu tiếp theo.

* **Xác định thời gian thủy phân thích hợp**

Thủy phân là một khâu quan trọng trong quá trình làm tiêu bản ở tế bào thực vật nhằm phá hủy thành tế bào, làm rã mềm hơn, dễ ép nén góp phần tích cực vào sự thành công của làm tiêu bản. Tuy nhiên, khi tiến hành làm tiêu bản quan sát nhiễm sắc thể (NST) trong giảm phân ở tinh hoàn châu chấu thì không cần thủy phân. Trong quan sát quá trình nguyên phân trên mẫu vật thực vật, thời gian thủy phân mẫu vật trong HCl 1N ở 60°C cũng có sự khác biệt giữa các loại mẫu: rễ hành cần thủy phân 10 phút còn rễ đậu tương lại chỉ cần 5 phút. Do đó, khi tiến hành làm tiêu bản trên phôi cá ngựa vằn việc xác định nên hay không nên thủy phân, thời gian thủy phân phù hợp là bao nhiêu sẽ quyết định độ thành công của kết quả tiêu bản, góp phần cải tiến quy trình thực hành.

Trong quá trình làm thí nghiệm trên phôi cá, nếu không thủy phân hầu như không thể quan sát thấy NST. Chính vì vậy chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu phương pháp thủy phân phôi cá ngựa vằn. Một số nghiên cứu chỉ ra việc thủy phân phôi cá bằng HCl 1N ở 60°C trong 5 phút cho

kết quả tốt hơn phôi không thủy phân [9]. Trong nghiên cứu này chúng tôi khảo sát ảnh hưởng của thời gian thủy phân phôi cá ngựa vằn đến chất lượng tiêu bản.

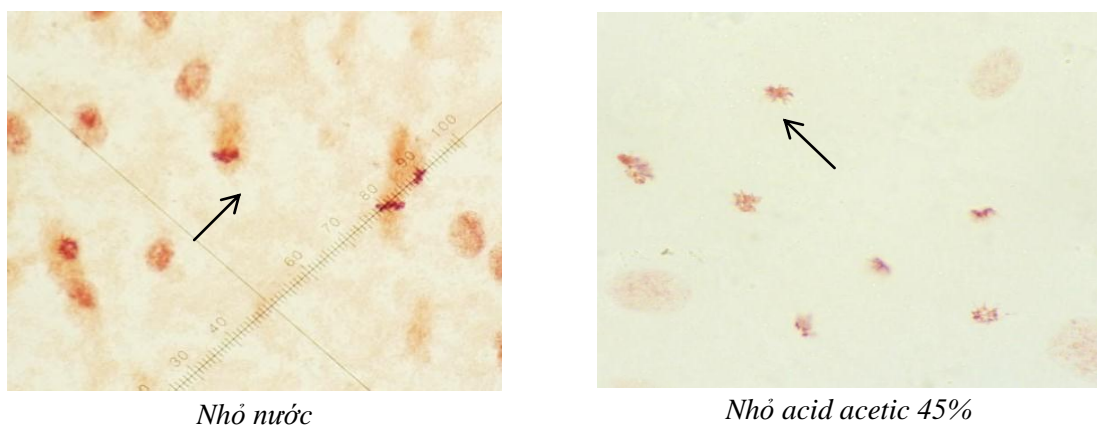


Hình 2. Tiêu bản ép tế bào phôi cá ở các thời gian thủy phân (vật kính 40X)

Từ kết quả thí nghiệm, có thể thấy thời gian thủy phân ảnh hưởng đến kết quả nhuộm phôi cá. Sau khi thủy phân 10 phút trong HCl 1N ở 60°C tiêu bản phôi cá có tế bào chất trong hơn do một lượng lớn chất dự trữ đã bị phân giải. Nhờ đó nhìn rõ NST hơn, việc quan sát dễ dàng hơn.

Bên cạnh bước thủy phân, khi tiến hành làm tiêu bản thường phải nhỏ thêm 1 giọt nước hoặc thuốc nhuộm để giúp việc ép tiêu bản dễ dàng hơn và giúp các tế bào không bị mất nước, giữ nguyên hình thái khi quan sát trên kính hiển vi. Việc làm tăng độ trong của tiêu bản giúp quan sát rõ hình thái của NST ở từng giai đoạn. Một số quy trình nhuộm, quan sát NST đã chỉ ra việc nhỏ acid acetic 45% bổ sung giúp tăng độ trong của tiêu bản. Căn cứ vào chất lượng tiêu bản NST cá ngựa vằn chúng tôi đã tiến hành thí nghiệm cải thiện độ trong tiêu bản sẽ giúp tăng chất lượng tiêu bản và cung cấp đầy đủ hơn quy trình làm tiêu bản trên phôi cá ngựa vằn.

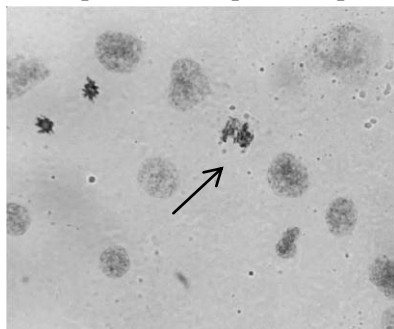
Nghiên cứu này đã tiến hành nhỏ bổ sung acid acetic 45% trong giai đoạn ép tiêu bản. Kết quả cho thấy, khi nhỏ bổ sung acid acetic tiêu bản trong hơn giúp nhìn rõ NST hơn. Điều này có thể lí giải là do acid acetic 45% có thể nhanh chóng làm mất màu thuốc nhuộm ở tế bào chất, nhưng quá trình này diễn ra chậm hơn ở các NST đã co ngắn đóng xoắn, do vậy giúp dễ dàng quan sát các giai đoạn của quá trình nguyên phân.



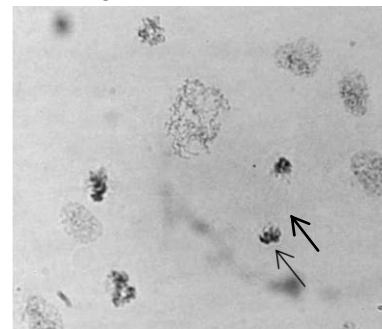
Hình 3. Tiêu bản ép phôi cá ở các dung dịch làm trong tiêu bản (vật kính 100X)

*** Xác định thời gian nhuộm phù hợp**

Thời gian nhuộm mẫu vật có ảnh hưởng đến mức độ bắt màu của NST và các thành phần khác của tế bào. Vì vậy, xác định thời gian nhuộm mẫu thích hợp là cần thiết để thu được tiêu bản đẹp, dễ quan sát. Kết quả thí nghiệm cho thấy nhuộm 20 phút bắt đầu quan sát được NST. Khi tăng thời gian nhuộm làm tế bào chất bắt màu đậm khó quan sát. Tuy nhiên, kết hợp nhỏ acid acetic 45% làm trong tiêu bản thì tiêu bản nhìn vẫn nhìn rõ, tế bào chất trong. Có thể thấy rõ chất lượng tiêu bản trong hình 4. Phôi bào được thủy phân 10 phút ở 60°C trong HCl 1N, nhuộm phù hợp cùng lúc trong orcein 1,25%, nhỏ acid acetic 45% giúp làm trong tiêu bản. Khi quan sát hai tiêu bản có thể nhận thấy mức độ bắt màu của NST ở tiêu bản nhuộm 60 phút chỉ hơi đậm hơn một chút so với NST ở tiêu bản 20 phút. Do đó, trong quá trình làm tiêu bản quan sát nguyên phân ở phôi cá ngựa vẫn có thể hạn chế thời gian nhuộm là khoảng 20 – 30 phút, lúc này độ bắt màu của NST đã rõ để quan sát các quá trình phân bào, thích hợp cho thời gian của một bài thực hành.

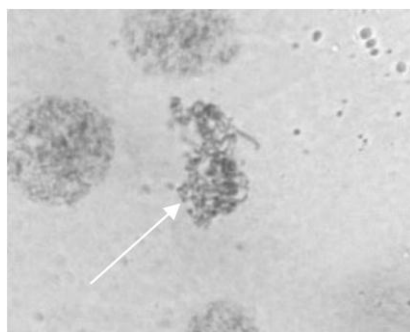


20 phút

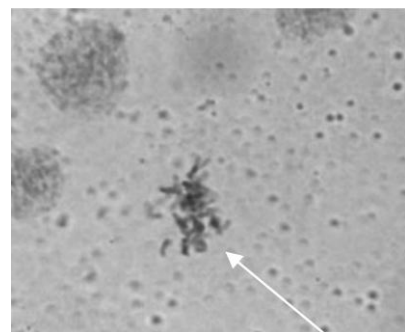


60 phút

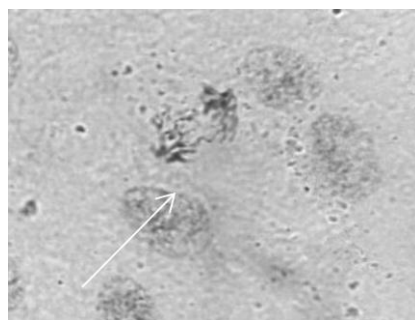
Hình 4. Tiêu bản tế bào phôi cá ở các khoảng thời gian nhuộm (vật kính 100X)



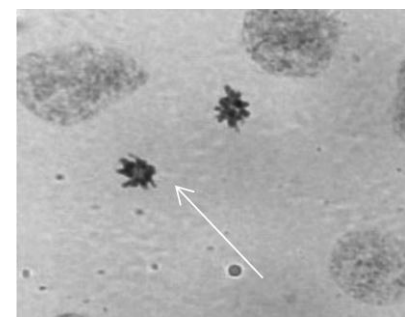
Kì đầu



Kì giữa



Kì sau



Kì cuối

Hình 5. Một số giai đoạn trong quá trình nguyên phân ở tế bào phôi cá ngựa vẫn

2.2.4. Đề xuất một số thí nghiệm thực hành

Từ các kết quả nghiên cứu trên đề xuất một số thí nghiệm thực hành cho học phần Tế bào học và Sinh học phát triển sử dụng phôi cá ngựa vằn như sau:

*** Quan sát quá trình nguyên phân ở tế bào động vật**

- Mục tiêu thí nghiệm:

Sinh viên làm được tiêu bản tạm thời quan sát nguyên phân ở trứng cá ngựa vằn
Sinh viên nhận biết được các đặc trưng của tế bào ở các kì phân bào nguyên phân

- Nguyên vật liệu:

+ Mẫu vật: Trứng cá ngựa vằn thu sau khi cá bố mẹ giao phối khoảng 2,5 đến 3 giờ, đã cố định và bảo quản trong cồn 70⁰ ở 4 - 8°C

+ Hóa chất: Thuốc nhuộm orcein 1,25%, acid acetic 45%, HCl 1N, dầu soi kính.

+ Dụng cụ: Kính hiển vi có vật kính 10X, 40X, 100X; ống Eppendorf, đĩa đồng hồ, lam kính, lamên, bể thủy phân, kim nhọn, giấy thấm, panh thí nghiệm.

- Tiến hành:

Hướng dẫn sinh viên các bước làm tiêu bản quan sát nguyên phân tế bào phôi cá ngựa vằn: thủy phân trứng, nhuộm mẫu, tách phôi, làm tiêu bản tạm thời và quan sát.

- Yêu cầu:

Xác định các kì của quá trình nguyên phân ở tế bào phôi cá ngựa vằn

Lưu ý: có thể mở rộng nội dung thí nghiệm như xác định chu kì tế bào phôi sớm (giai đoạn phân cắt trứng) và chu kì tế bào giai đoạn sau phân cắt.

*** Quan sát đặc điểm một số giai đoạn phát triển cá thể động vật**

- Mục tiêu thí nghiệm:

+ Sinh viên quan sát và nhận biết được giai đoạn phát triển phôi sớm ứng với các thời gian thu phôi ở cá ngựa vằn.

+ Sinh viên quan sát và nhận biết được những đặc điểm đặt trưng của phôi cá ngựa vằn bình thường.

- Nguyên vật liệu:

+ Mẫu vật: Trứng cá ngựa vằn thu sau khi cá bố mẹ giao phối tại các thời điểm 15 phút, 30 phút, 45 phút, 60 phút, 75 phút, 90 phút, 105 phút, 120 phút, 135 phút, 150 phút, 165 phút, 180 phút, 4 giờ, 5 giờ, 6 giờ, 12 giờ, 24 giờ, 48 giờ, 52 giờ đã cố định và bảo quản trong cồn 70⁰ ở 4 - 8°C.

+ Dụng cụ: Kính hiển vi có vật kính 4X, 10X hoặc kính hiển vi soi nổi, lam kính, panh thí nghiệm, ống hút nước dùng trong thí nghiệm

+ Hóa chất: nước cất

- Tiến hành: Hướng dẫn sinh viên các bước lấy phôi quan sát dưới kính hiển vi.

- Yêu cầu:

+ Xác định được kiểu phân cắt trứng của cá ngựa vằn

+ Xây dựng được hệ thống các giai đoạn trong quá trình phát triển phôi cá và trình bày đặc điểm của từng giai đoạn (vị trí phôi; số lượng, kích thước tế bào; kích thước phôi bào so với kích thước khối noãn hoàng, phôi nang, phôi vị, hình thành thần kinh, đốt sống).

3. Kết luận

Thời gian cho cá giao phối hiệu quả nhằm thu phôi cá ngựa vằn phục vụ cho dạy và học thực hành tế bào và sinh học phát triển là 45 phút với hiệu suất thụ tinh đạt khoảng 89,5%, số trứng được sinh ra khoảng 126 trứng, số trứng được thụ tinh khoảng 113 trứng; Sử dụng phôi cá làm tiêu bản ép quan sát nguyên phân phôi bào cá cần thủy phân phôi cá trong HCl 1N ở 60°C trong 10 phút, nhuộm bằng orcein 1,25% trong 20 phút và bổ sung 1 giọt acid acetic 45% khi ép mẫu.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] M. S. Tyler, 1994. *Developmental biology: a guide for experimental study* (No. Sirsi) 19780878938346, pp. 276-294.
- [2] M. Westerfield, 2000. *The zebrafish book: A guide for the laboratory use of zebrafish*. University of Oregon Press, Eugene.
- [3] Trần Thị Phương Dung, Nguyễn Hiếu, Nguyễn Thị Phương Huyền, 2014. *Đánh giá sự tác động của chì lên quá trình phát triển phôi ở cá ngựa vằn (Danio rerio)*. Tạp chí Khoa học Đại học Sư phạm Thành phố Hồ Chí Minh Vol. 61, tr. 122-131.
- [4] P. J. Keller, A.D. Schmidt, J. Wittbrodt, E. H. Stelzer, 2008. *Reconstruction of zebrafish early embryonic development by scanned light sheet microscopy*. Science, 322(5904), tr.1065-1069.
- [5] M. Mimeault, S. K. Batra, 2013. *Emergence of zebrafish models in oncology for validating novel anticancer drug targets and nanomaterials*. Drug discovery today 18(3-4), pp. 128-140.
- [6] N. Nowik, P. Podlasz, A. Jakimiuk, N. Kasica, W. Sienkiewicz, & J. Kaleczyc, 2015. *Zebrafish: an animal model for research in veterinary medicine*. Polish journal of veterinary sciences, 18(3), pp. 663-674.
- [7] J. T. Shin, M. C. Fishman, 2002. *From zebrafish to human: modular medical models*. Annual Review of Genomics and Human Genetics, 3(1), pp. 311-340.
- [8] A. I. Idilli, F. Precazzini, M. C. Mione and V. Anelli, 2017. *Zebrafish in Translational Cancer Research: Insight into Leukemia, Melanoma, Glioma and Endocrine Tumor Biology*. Genes 8(9), 236.
- [9] Trương Thị Nhân, 2017. *Hoàn thiện quy trình làm tiêu bản quan sát Nhiễm sắc thể trong nguyên phân ở tế bào phôi cá ngựa vằn (Danio rerio)*. Luận văn tốt nghiệp. Đại học Sư phạm Hà Nội.
- [10] Dương Thùy Linh, Hoàng Thị Mỹ Hạnh, Nguyễn Lai Thành, 2016. *Đánh giá tác động của Acetaminophen lên sự phát triển phôi cá ngựa vằn (Danio rerio)*. Tạp chí Khoa học Đại học Quốc gia Hà Nội: Khoa học Y Dược, 32(1), tr. 60-66.
- [11] Trần Đức Long, Vũ Thị Thu, Tô Thanh Thuý, 2015. *Cá ngựa vằn và cá medaka làm mô hình nghiên cứu bệnh người*. Hội nghị Khoa học Công nghệ Tuổi trẻ Khoa Y Dược lần II tr. 103-117.
- [12] Nguyễn Như Hiền, 2008. *Sinh học tế bào*. Nxb Giáo dục Hà Nội, tr. 213-247.
- [13] Mai Văn Hưng, 2009. *Sinh học phát triển cá thể động vật*. Nxb Đại học Sư phạm, tr. 79-100.
- [14] Nguyễn Xuân Việt, 2016. *Thực hành Tế bào học*. Nxb Đại học Sư phạm Hà Nội.

ABSTRACT

Some factors affecting collection and use of Zebrafish (*Danio rerio*) embryos in the teaching and learning practice of Cytology and Developmental Biology

Dao Thi Sen¹, Chu Thi Thu Ngoc² and Mai Van Hung²

¹Faculty of Biology, Hanoi National University of Education

²University of Education, Vietnam National University, Hanoi

Zebrafish (*Danio rerio*) shows excellent experimental characteristics, so it is used as an animal model for research in Biology and Biomedicine, especially in human diseases. Our study investigated some factors affecting collection and use of Zebrafish embryos in the teaching and learning practice of Cell Biology and Developmental Biology. Results showed that the time for mating was 45 minutes with the efficiency of fertilization of 89.5%; the number of eggs was about 126 eggs/fish/time, the number of eggs being fertilized was about 113 eggs/fish/time; fish embryos were suitable for using in the practice of cytology and developmental biology as fish embryos developed rapidly, with less time of variation; using fish embryos to make microscope slides observation mitosis: digestion hydrolysis of Zebrafish embryos in HCl 1N at 60°C for 10 minutes, staining with orcein 1.25% for 20 minutes and adding 1 drop of acetic acid 45% when form was pressed.

Keywords: Zebrafish, mitosis, early embryonic development, cytology, developmental biology.