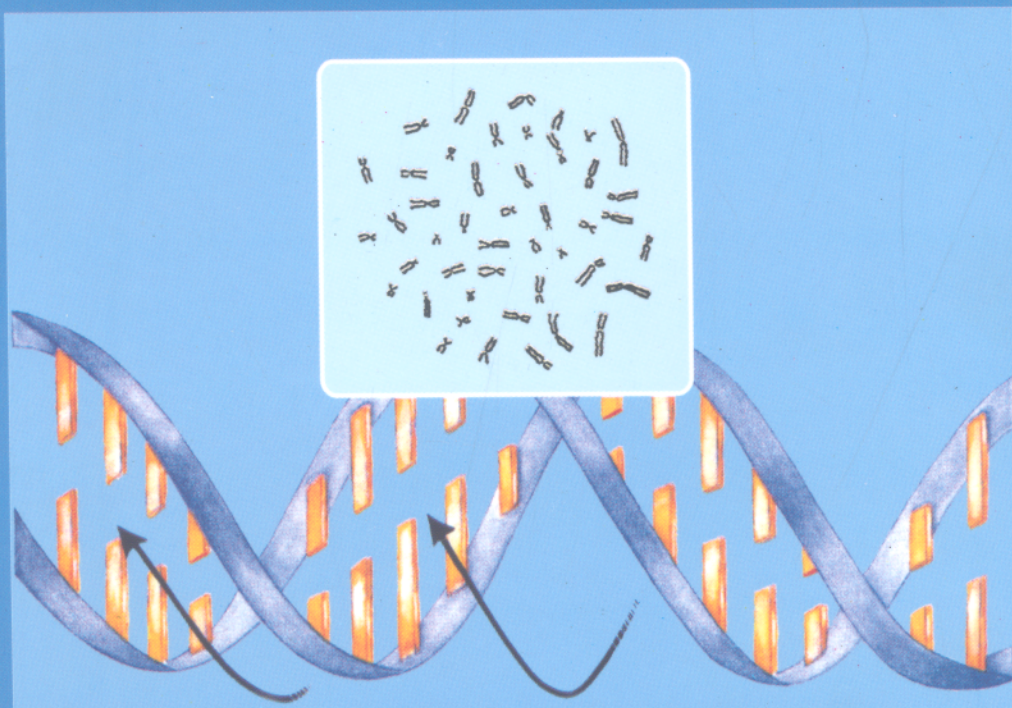


TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI
BỘ MÔN Y SINH HỌC - DI TRUYỀN

THỰC TẬP DI TRUYỀN Y HỌC

(SÁCH DÀNH CHO SINH VIÊN)



NHÀ XUẤT BẢN Y HỌC

TRƯỜNG ĐẠI HỌC Y HÀ NỘI
BỘ MÔN Y SINH HỌC - DI TRUYỀN

THỰC TẬP DI TRUYỀN Y HỌC

(SÁCH DÀNH CHO SINH VIÊN)

NHÀ XUẤT BẢN Y HỌC
HÀ NỘI - 2006

HIỆU DÍNH

GS. TS. Trịnh Văn Bảo

NHÓM BIÊN SOẠN

TS. Phan Thị Hoan

PGS.TS. Trần Thị Thanh Hương

ThS. Hoàng Thị Ngọc Lan

PGS.TS. Trần Đức Phấn

ThS. Nguyễn Văn Rực

TS. Nguyễn Thị Trang

ThS. Lương Thị Lan Anh

*Có sự tham gia của tập thể cán bộ Bộ môn Y sinh học - Di truyền
Trường Đại học Y Hà Nội*

MỤC LỤC

	<i>Trang</i>
Bài 1. Nếp vân da bàn tay	7
1. Mục tiêu	7
2. Phương pháp học	7
3. Phương tiện, dụng cụ	7
4. Câu hỏi lý thuyết	8
5. Nội dung	8
6. Đánh giá kết quả thực hành	11
Bài 2. Vật thể giới - cách làm tiêu bản để xét nghiệm vật thể Barr	12
1. Mục tiêu	12
2. Phương pháp học	12
3. Phương tiện dụng cụ	12
4. Câu hỏi lý thuyết	12
5. Nội dung	13
6. Đánh giá kết quả thực hành	15
Bài 3. Kỹ thuật nuôi cấy tế bào lympho máu ngoại vi để làm tiêu bản nhiễm sắc thể người	16
1. Mục tiêu	16
2. Phương pháp học	16
3. Phương tiện dụng cụ	16
4. Câu hỏi lý thuyết	18
5. Nội dung	18
6. Đánh giá kết quả thực hành	21
Bài 4. Phương pháp xếp bộ nhiễm sắc thể người (lập karyotyp người)	22
1. Mục tiêu	22
2. Phương pháp học	22
3. Phương tiện dụng cụ	22
4. Câu hỏi lý thuyết	23

5. Nội dung	23
6. Tra đánh giá kết quả thực hành	24
Bài 5. Phân tích karyotyp của một số bệnh di truyền và một số dạng đột biến nhiễm sắc thể	26
1. Mục tiêu	26
2. Phương pháp học	26
3. Phương tiện dụng cụ	26
4. Câu hỏi lý thuyết	26
5. Nội dung	26
6. Đánh giá kết quả thực hành	31
Bài 6. Một số kỹ thuật sinh học phân tử thông dụng ứng dụng trong y học	32
1. Mục tiêu	32
2. Phương pháp học	32
3. Phương tiện dụng cụ	32
4. Câu hỏi lý thuyết	34
5. Nội dung	34
6. Đánh giá kết quả thực hành	38
Bài 7. Phương pháp con sinh đôi, di truyền quần thể, di truyền sinh hoá	39
1. Mục tiêu	39
2. Phương pháp học	39
3. Phương tiện dụng cụ	39
4. Câu hỏi lý thuyết	40
5. Nội dung	40
6. Đánh giá kết quả thực hành	46
Bài 8. Nghiên cứu các bệnh di truyền đơn gen bằng phương pháp gia hệ	47
1. Mục tiêu	47
2. Phương pháp học	47
3. Phương tiện dụng cụ	47

4. Câu hỏi lý thuyết	47
5. Nội dung	48
6. Đánh giá kết quả thực hành	54
Bài 9. Hình ảnh một số bất thường bẩm sinh, hội chứng và bệnh di truyền	55
1. Mục tiêu	55
2. Phương pháp học	55
3. Phương tiện dụng cụ	55
4. Câu hỏi lý thuyết	55
5. Nội dung	55
6. Tra đánh giá kết quả thực hành	55

Bài 1

NẾP VÂN DA BÀN TAY

1. MỤC TIÊU

- In được nếp vân da bàn tay đúng tiêu chuẩn.
- Sử dụng đúng các thuật ngữ chính của phương pháp nếp vân da để phân tích nếp vân da bàn tay và ngón tay.

2. PHƯƠNG PHÁP HỌC

- Học trước phần lý thuyết về nếp vân da.
- Tự in nếp vân da của hai bàn tay mình.
- Tự đánh giá và ghi kết quả trên bản in nếp vân da bàn tay mình.
- Quan sát một số hình ảnh nếp vân da bàn tay hiếm gặp.

3. PHƯƠNG TIỆN, DỤNG CỤ

3.1. Cho một sinh viên

- 1 kính lúp cầm tay.
- 1 thước kẻ.

3.2. Cho cả tổ sinh viên

- 1 bàn để in nếp vân da.
- Mực in.
- Miếng mút xốp để lấy mực.
- Kẹp để bôi mực.
- 1 bánh xà phòng hoặc 100g xà phòng bột.
- Nước sạch để rửa tay.
- Giấy và khăn lau tay.
- Một số hình ảnh nếp vân da một số bàn tay hiếm gặp và một số hình ảnh về các hội chứng di truyền có nếp vân da bàn tay hiếm gặp.

4. CÂU HỎI LÝ THUYẾT

1. Định nghĩa các thuật ngữ: Nếp hay rãnh là gì? Đường vân là gì? Hoa vân là gì? Ngã ba là gì?
2. Nếp vân da bàn tay của các cá thể có giống nhau không, vì sao?
3. Nếp ngang duy nhất là gì?
4. Hoa vân cung là gì?
5. Nói vị trí của ngã ba t" trên lòng bàn tay.

5. NỘI DUNG

5.1. Cách in nếp vân da bàn tay

Dùng kẹp kẹp miếng mút xốp đã thấm mực in Ronéo bôi nhẹ nhàng một lớp mỏng và đều lên toàn bộ bàn tay và ngón tay, bôi mực hơi lan ra mép của bàn, ngón tay và xuống dưới nếp lằn cổ tay.

Khi in, bàn tay để một cách tự nhiên, không xoè quá, không khép quá. Áp sát bàn tay xuống mặt giấy, dùng tay bên kia ấn vào kẽ các ngón tay, dùng cổ hoặc mu bàn tay kia ấn phần mu bàn tay đang in để các vân ở lòng bàn tay cũng được in rõ trên giấy.

Nhấc bàn tay lên bắt đầu từ phía ngón rồi tới lòng bàn tay, ấn cổ tay lên mặt giấy để lấy được nếp lằn cổ tay.

In ngón tay của từng bàn tay ngay phía dưới bàn tay theo thứ tự tương ứng với các ngón trên bàn tay đã in. Khi in ngón không day ngón mà chỉ lăn nhẹ một lần từ phía cạnh này sang cạnh bên kia từng ngón tay để lấy cho đủ các ngã ba vân trên đốt ba của ngón tay.

5.2. Phân tích đặc điểm nếp vân tay

Sử dụng bản in nếp vân da bàn tay của mình:

5.2.1. Ghi chú tên và nhận xét về 3 nếp (rãnh) lớn trên lòng bàn tay: nếp dọc, nếp ngang gần, nếp ngang xa (có thể có nếp ngang duy nhất).

5.2.2. Xác định và ghi chú các miền gần, miền xa lòng bàn tay, bờ quay R, bờ trụ U của bàn tay.

5.2.3. Xác định và đánh số các gò: Gò I (gò cái), gò II (nằm giữa đáy ngón trỏ và ngón giữa), gò III (giữa hai đáy ngón giữa và nhẫn), gò IV (giữa hai đáy ngón nhẫn và út) và gò V nằm rải dài dưới đáy ngón út ở bờ trụ.

5.2.4. Xác định và đánh số các miền xung quanh bàn tay từ 1 đến 13 (hình 1.1).

5.2.5. Xác định các ngã ba lòng tay và ghi chú tên của chúng trên hình in hai bàn tay của mình (hình 1.2).

Tên các ngã ba được quy định như sau:

- Ngã ba a (đáy ngón trỏ).
- Ngã ba b (đáy ngón giữa).
- Ngã ba c (đáy ngón nhẫn).
- Ngã ba d (đáy ngón út).

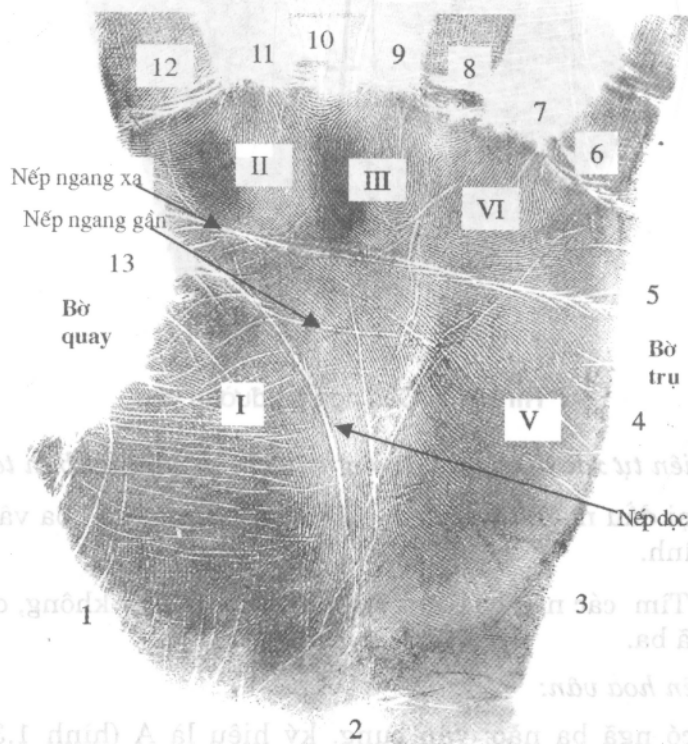
Nếu không có thì gọi là ngã ba không, ví dụ đáy ngón nhẫn không có ngã ba thì ký hiệu c_0 .

Lưu ý:

Một số ít trường hợp bên cạnh ngã ba a và d còn có các ngã ba phụ, ngã ba phụ được ký hiệu a' và d'. Trên gò cái còn có thể có 2 ngã ba: a (ở phía trên), f (ở phía dưới) hoặc chỉ có một trong hai ngã ba ấy. Trên gò út cũng có thể có ngã ba h, nhưng rất hiếm. Các ngã ba f, h chỉ xuất hiện ở ô mô cái hoặc ô mô út có hoa vân.

Đọc theo trục lòng bàn tay trên đường thẳng kéo từ giữa nếp cổ tay tới phía các ngón tay có các ngã ba trục (hình 1.2):

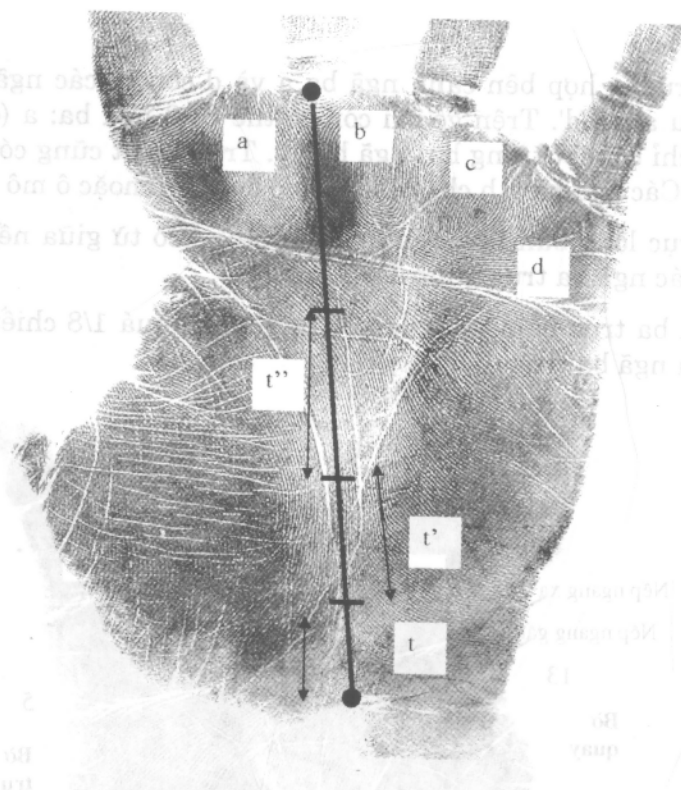
- Nếu ngã ba trục nằm cách nếp cổ tay không quá $1/8$ chiều dài đường trục thì gọi là ngã ba trục t.



Hình 1.1. Các nếp, các miền, các gò trên lòng bàn tay

- Nếu ngã ba trục nằm ở giữa đường trục hoặc trên dưới không quá 1/8 chiều dài đường trục thì gọi là ngã ba trục t".
- Nếu ngã ba trục nằm ở vị trí trung gian giữa t và t" gọi là ngã ba trục t'.

5.2.6. Đường vân chính: Đường vân chính là đường vân dài nhất và rõ nhất trong số ba đường vân tạo thành ngã ba. Đường vân chính được gọi tên bằng chữ số chỉ tên miền mà nó kết thúc. Ví dụ: đường vân chính của ngã ba a kết thúc tại miền 4 thì ký hiệu là A4 (hình 1.2).



Hình 1.2. Các ngã ba đường vân

Mỗi sinh viên tự xác định một đường vân chính của hai bàn tay mình

5.2.7. Hoa vân tại đầu ngón tay: Nhận biết và gọi đúng tên hoa vân của mười ngón tay của chính mình.

Cách làm: Tìm các ngã ba: từng ngón có ngã ba hay không, có 1 hay 2 ngã ba hay không có ngã ba.

Xác định tên hoa vân:

- Không có ngã ba nào: vân cung, ký hiệu là A (hình 1.3a). Đôi khi vân cung có một ngã ba nhưng lại nằm ở chính giữa và cụt thì vân cung được gọi là cung lều ký hiệu là A^T.
- Có một ngã ba trục trên ngón tay: vân móc ký hiệu là L (hình 1.3b). Vân móc có hai loại:

- + Vân móc quay: chiều mở của bó đường vân quay về phía bờ quay.
- + Vân móc trụ: chiều mở của bờ đường vân quay về phía bờ trụ.
- Có 2 ngã ba trên một ngón tay: vân vòng (hay vân cuốn). Ký hiệu là W. Có nhiều loại vân vòng (hình 1.3c).
 - + Vòng kín đồng tâm (1)
 - + Vòng hở đồng tâm (2)
 - + Vòng xoắn (3)
 - + Vòng móc kép (4)
 - + Vòng ra- kết (5) (hình ra-kết nhỏ bên trong và các vòng bao quanh không liền kín).

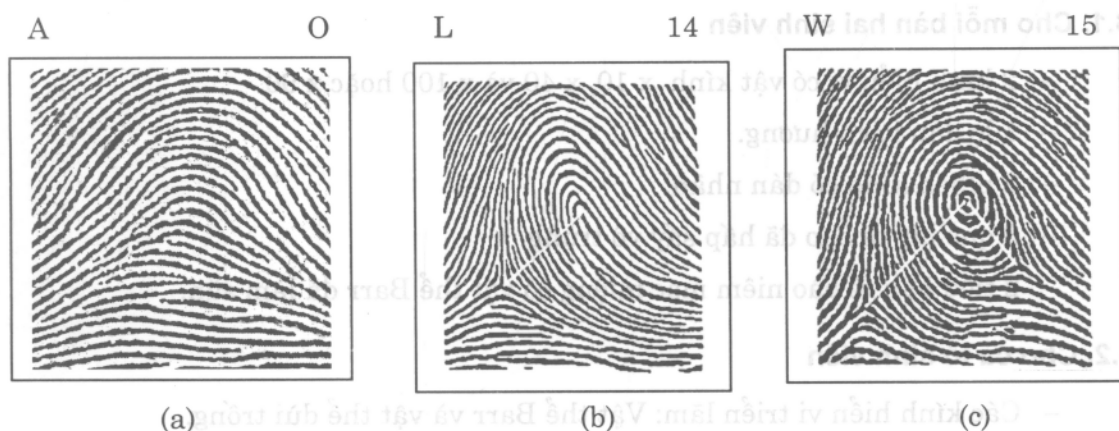
5.2.8. Đếm số đường vân đầu ngón tay và tính tổng số đường vân

Để xác định độ thưa hay mau của đường vân, người ta dùng các công thức về số lượng. Muốn làm được phải biết đếm đường vân. Có thể dùng kính lúp cầm tay để đếm tổng số đường vân.

Cách đếm: Kéo một đường thẳng nối tâm ngã ba đến tâm của hoa vân móc hoặc vòng cắt ngang qua các đường vân của hoa vân. Đường được đếm là đường bị đường thẳng ấy cắt ngang qua (trong trường hợp có 2 tâm ngã ba thì tính số đường vân bên nào nhiều hơn).

Chỉ số về tổng số đường vân là tổng số các đường vân của các đầu ngón tay được đếm.

Ví dụ: xem hình 1. 3.



Hình 1.3. Các loại hoa vân và tính số đường vân

6. ĐÁNH GIÁ KẾT QUẢ THỰC HÀNH

1. Ghi chú các nếp, các miền, các gò, các ngã ba của đường vân trên bản in nếp vân da bàn tay.
2. Xác định vị trí của ngã ba trụ.
3. Xác định các loại hoa vân, tính tổng số đường vân của các ngón tay.

Bài 2

VẬT THỂ GIỚI - CÁCH LÀM TIÊU BẢN ĐỂ XÉT NGHIỆM VẬT THỂ BARR

1. MỤC TIÊU

- Tự làm được tiêu bản tế bào niêm mạc để xét nghiệm vật thể Barr.
- Sử dụng được vật kính dầu để tự tìm, quan sát và vẽ được vật thể Barr.
- Quan sát được vật thể đuôi trống và vật thể Y.

2. PHƯƠNG PHÁP HỌC

- Học bài lý thuyết về vật thể giới và đọc lại phần sử dụng vật kính dầu ở bài thực tập số 1 (phần nguyên lý sinh học).
- Tự làm một tiêu bản tế bào niêm mạc miệng để quan sát vật thể Barr.
- Quan sát và vẽ hình ảnh các loại vật thể giới.

3. PHƯƠNG TIỆN DỤNG CỤ

3.1. Cho mỗi bàn hai sinh viên

- 2 kính hiển vi có vật kính x 10, x 40 và x 100 hoặc x 90.
- 1 lọ dầu bách hương.
- 2 phiến kính có dán nhãn.
- 2 que lấy tế bào đã hấp sấy vô trùng.
- 2 tiêu bản tế bào niêm mạc miệng có vật thể Barr đã làm sẵn.

3.2. Cho cả tổ sinh viên

- Các kính hiển vi triển lãm: Vật thể Barr và vật thể đuôi trống.
- Bộ ảnh và tranh về vật thể giới.
- 2 bộ dụng cụ để làm nhuộm tiêu bản vật thể Barr.

4. CÂU HỎI LÝ THUYẾT

1. Kể tên các dạng vật thể giới?
2. Trình bày nguồn gốc của vật thể Barr?

3. Trình bày nguồn gốc của vật thể Y?
4. Nói ý nghĩa của việc xét nghiệm vật thể giới?

5. NỘI DUNG

5.1. Làm tiêu bản tế bào niêm mạc miệng để xét nghiệm vật thể Barr

Bộ dụng cụ làm tiêu bản:

- Phiếu kính sạch có dán nhãn.
- Que lấy tế bào niêm mạc miệng: Que có thể làm bằng tre, gỗ hoặc kim loại dài 15 cm, rộng 1cm vót một đầu tù nhọn để lấy tế bào, đầu kia có thể vát hoặc bằng để phân biệt hai đầu. Que phải xử lý vô trùng (lấy riêng cho từng bệnh nhân).
- Chén và nước sôi để nguội để súc miệng.
- 1 lọ dung dịch định hình cồn ether 1:1
- 1 cốc đựng thuốc nhuộm.
- Giấy thấm.
- 3 cốc nước sạch để rửa tiêu bản.

Cách làm:

- Ghi nhãn tên bệnh nhân.
- Cho bệnh nhân súc miệng.
- Lấy bệnh phẩm: Tay phải cầm que lấy tế bào, yêu cầu bệnh nhân há to miệng nạo nhẹ niêm mạc miệng ở mặt trong má.
- Dàn mỏng tế bào trên phiến kính thành một hình tròn đường kính khoảng 1,5 cm ở phía không dán nhãn.
- Định hình: Để cho tiêu bản se mặt rồi định hình bằng cồn ether 1:1.
- Nhuộm: Đặt tiêu bản trong ống thuốc nhuộm theo chiều thẳng đứng sao cho nhãn không bị ngấm thuốc nhuộm. Thời gian 10 phút với thuốc nhuộm xanh toluidin, 15 phút với thuốc nhuộm hematoxylin oxyd thủy ngân.
- Rửa tiêu bản: Rửa nhúng lần lượt qua 3 cốc nước sạch, dựng tiêu bản trên giấy thấm, lau khô mặt trái để khô tự nhiên.
- Quan sát, đánh giá.

5.2. Quan sát, đánh giá tiêu bản vật thể Barr

Phải sử dụng vật kính dầu để quan sát, đánh giá:

- Ôn lại cách sử dụng vật kính dầu (vật kính x 90, x 100).
- Điều chỉnh kính để quan sát được hình thể tế bào niêm mạc miệng ở vật kính x 10.

- Khi thấy rõ được tế bào và nhân thì giữ nguyên độ cao mâm kính, quay vật kính x 10 ra phía trước, xoay vật kính dầu vào trục quang học vật kính dầu ngập vào giọt dầu là được (có thể quan sát từ vật kính x 10, vật kính x 40, sau đó quan sát ở vật kính dầu).
- Mắt nhìn vào thị kính, tay chỉ được điều chỉnh ốc nhỏ và xe đẩy tiêu bản để tìm và nhận biết vật thể giới.

Quan sát và đánh giá trên tiêu bản tự làm:

- Chỉ đánh giá vật thể Barr ở những tế bào có nhân đứng riêng rẽ, bắt màu đồng đều, bờ nhân rõ nét và đều.
- Không đánh giá vật thể Barr ở những tế bào có các nhân chồng lên nhau, bờ nhân gấp, rách, nhân bắt màu quá đậm hoặc màu nhạt.
- Chú ý phân biệt vi khuẩn và cặn thuốc nhuộm với vật thể Barr. Cần phân biệt vật thể Barr với các khối chất nhiễm sắc thể ở các loại tế bào khác.
- Vật thể Barr là một nhiễm sắc thể X dị kết đặc, bắt màu đậm, hình chóp hoặc hình thấu kính nằm áp sát mặt trong màng nhân tế bào, kích thước 1,2 micromet. Tỷ lệ vật thể Barr trong nhân tế bào từ 10 – 25% vì vậy phải di chuyển tiêu bản để quan sát trên nhiều tế bào. Có thể quan sát 50 tế bào để rút ra tỷ lệ vật thể Barr.



Hình 2.1. Tế bào với vật thể Barr

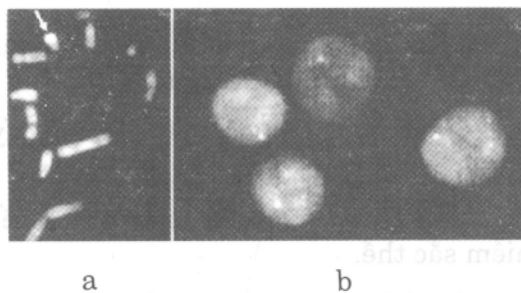
5.3. Quan sát vật thể dùi trống (drumstick): Xem tiêu bản triển lãm

Ở tiêu bản máu đàn của người phụ nữ, một số bạch cầu nhân múi có phần phụ nhỏ hình tròn hoặc bầu dục, có đường kính 1 - 1,5 micromet, bắt màu đậm, nổi với nhân bằng một sợi mảnh màu hơi nhạt. Phần phụ này gọi là vật thể dùi trống. Thường đánh giá vật thể dùi trống ở bạch cầu nhân 3 hoặc 4 múi.



Hình 2.2. Bạch cầu nhân mũi với vật thể dùi trống

5.4. Vật thể Y: Xem ảnh (Hình 2.3)



Hình 2.3. Với phương pháp nhuộm huỳnh quang

a. Vật thể Y ở kỳ giữa

b. Vật thể Y ở nhân gian kỳ

6. ĐÁNH GIÁ KẾT QUẢ THỰC HÀNH

1. Trình bày các bước làm tế bào niêm mạc miệng để xét nghiệm vật thể Barr.
2. Đưa vào đầu que chỉ ở vật kính dầu hình ảnh vật thể Barr ở tiêu bản tự làm.
3. Đưa vào đầu que chỉ một hoặc một vùng tế bào niêm mạc miệng không đủ tiêu chuẩn để đánh giá ở tiêu bản tự làm.
4. Đưa vào vị trường vùng tế bào có đủ tiêu chuẩn để đánh giá vật thể Barr.

Bài 3

KỸ THUẬT NUÔI CẤY TẾ BÀO LYMPHO MÁU NGOẠI VI ĐỂ LÀM TIÊU BẢN NHIỄM SẮC THỂ NGƯỜI

1. MỤC TIÊU

- Trình bày được các phương tiện, dụng cụ, hoá chất và nguyên tắc xử lý dụng cụ để nuôi cấy tế bào lympho máu ngoại vi.
- Trình bày được tiến trình kỹ thuật nuôi cấy, thu hoạch tế bào lympho máu ngoại vi và làm tiêu bản nhiễm sắc thể.
- Nhỏ được tế bào lên tiêu bản, nhuộm được tiêu bản, quan sát được tiêu bản nhiễm sắc thể của người.

2. PHƯƠNG PHÁP HỌC

- Chuẩn bị lý thuyết: Học trước phần về nguyên tắc làm tiêu bản nhiễm sắc thể người, đặc điểm bộ nhiễm sắc thể người.
- Quan sát phòng cấy, các dụng cụ hoá chất để nuôi cấy, thu hoạch, làm tiêu bản nhiễm sắc thể.
- Quan sát tiến trình kỹ thuật nuôi cấy, thu hoạch tế bào máu ngoại vi để làm tiêu bản nhiễm sắc thể.
- Tự nhỏ tế bào lên tiêu bản, nhuộm tiêu bản, quan sát tiêu bản ở vật kính x10, x40, phân biệt các dạng nhiễm sắc thể ở vật kính x10, x40.

3. PHƯƠNG TIỆN DỤNG CỤ

3.1. Cho mỗi sinh viên: Một kính hiển vi quang học

3.2. Cho cả tổ sinh viên

3.2.1. Một lọ chứa dịch treo tế bào sau thu hoạch

3.2.2. Các phương tiện, dụng cụ hoá chất để nuôi cấy tế bào lympho máu ngoại vi để làm tiêu bản nhiễm sắc thể

3.2.2.1. Trang thiết bị

- Buồng cấy tế bào: Thường sử dụng buồng cấy thổi. Trong buồng cấy phải có hệ thống lọc khí tiệt trùng, có hệ thống thổi không khí với áp lực mạnh để chỉ có các không khí đã được tiệt trùng lưu thông trong buồng cấy, ngoài ra

còn có đèn tím để diệt trùng, các giá để ống nghiệm, ống ly tâm, đèn cồn, hộp đựng bông đã diệt trùng, lọ đựng cồn 90° - 100°...

- Chai đựng môi trường (250ml - 500 ml - 1000ml).
- Chai cất 30 ml - 60 ml.
- Bơm tiêm 1ml, 2ml, 5ml, 10ml, 20ml. Các dụng cụ thuỷ tinh phải là thuỷ tinh trung tính.
- Hộp nhôm đựng các dụng cụ để sấy diệt trùng.
- Nút bông, nút cao su, giấy bọc, dây cao su...
- Áo quần, mũ, khẩu trang vô trùng.
- Kính hiển vi quang học.
- Tủ sấy, tủ lạnh, tủ ấm 37°C để nuôi cấy (Nếu có tủ ấm CO₂ 37°C thì tốt).

3.2.2.2. Hoá chất

- Môi trường nuôi cấy thông dụng là TC 199 (Parker) hoặc F12, F10...
- Huyết thanh: Có thể là huyết thanh tự thân (huyết thanh của chính người lấy tế bào lympho để nuôi cấy) hoặc huyết thanh bào thai bê, hoặc huyết thanh AB, huyết thanh máu dây rốn.
- PHA (phytohemagglutinin).
- Heparin.



Hình 3.1. Một số hoá chất nuôi cấy thông dụng và mẫu tế bào nuôi cấy

3.2.3. Chuẩn bị dụng cụ hoá chất để thu hoạch tế bào nuôi cấy và làm tiêu bản nhiễm sắc thể

3.2.3.1. Phương tiện dụng cụ

- Giá để ống ly tâm.
- Ống ly tâm (tốt nhất là đáy nhọn) 10ml.
- Các chai đựng dung dịch nhuộm trương, dung dịch để cố định (100 - 200ml).
- Các chai đựng Giemsa, đựng dung dịch đậm để nhuộm tiêu bản nhiễm sắc thể.
- Các ống để nhuộm.
- Pipet Pasteur.
- Bơm tiêm (10ml).
- Cốc thuỷ tinh.
- Phiến kính: Sạch, không bị xước.
- Máy ly tâm tốt nhất là loại ly tâm theo hướng thẳng đứng để cặn tế bào lắng ở đáy.
- Tủ lạnh, tủ ấm, cân phân tích, kính hiển vi quang học...

3.2.3.2. Hoá chất

- Dung dịch nhuộm trương KCl 0,075M.
- Dung dịch định hình:
 - + Acid acetic: CH_3COOH .
 - + Methanol: CH_3OH .
- Hoá chất dùng làm dừng tế bào ở kỳ giữa: Colcemid.
- Thuốc nhuộm: Giemsa, các dung dịch đậm để nhuộm: dung dịch đậm phosphat: Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 .

4. CÂU HỎI LÝ THUYẾT

1. Trình bày nguyên tắc làm tiêu bản nhiễm sắc thể người?
2. Trình bày đặc điểm nhiễm sắc thể người?

5. NỘI DUNG

5.1. Giới thiệu quy trình xử lý dụng cụ nuôi cấy

Các dụng cụ thuỷ tinh mới dùng lần đầu nên luộc trong bột tẩy rửa 20 phút, sau đó dùng chổi lông cọ kỹ. Những lần sau chỉ cần cọ kỹ trong bột tẩy rửa sau đó rửa sạch bằng nước máy nhiều lần.

- Ngâm trong NaOH 1N (40g/ lít) x 24 giờ sau đó rửa kỹ bằng nước máy nhiều lần.
- Ngâm trong HCl 1% x 24giờ → rửa kỹ bằng nước máy nhiều lần.
- Ngâm nước cất 1 lần x 2giờ → súc sạch.
- Ngâm nước cất 2 lần x 2giờ → súc sạch.
- Để khô, đập nút bông (các nút bông làm bằng bông không thấm nước).

Các pipet và bơm tiêm cần bơm rửa nhiều lần, xử lý theo các bước tương tự như trên.

Đối với các kim tiêm cần phải thông, rửa thông trong bột tẩy rửa; sau đó rửa sạch bằng nước máy nhiều lần.

- Ngâm trong ethanol 96° x 30 phút.
- Ngâm trong nước cất 1 lần x 2giờ.
- Ngâm trong nước cất 2 lần x 2giờ sau đó để khô.

Các dụng cụ thông thường cho vào hộp nhôm để sấy ở nhiệt độ 120 - 150°C trong 1 giờ.

Đối với các nút cao su: Nếu dùng lần đầu luộc trong bột tẩy rửa hoặc NaOH 0,5N x 15 phút (dung dịch phải ngập các nút cao su). Những lần sau chỉ cần cọ kỹ bằng bột tẩy rửa; cọ từng chiếc nhất là mặt dưới của nút. Rửa nước thường nhiều lần; ngâm nước cất 1 lần x 2giờ; nước cất 2 lần x 2giờ, đóng gói từng chiếc hấp ẩm với áp lực 1 atmophe x 30 phút hoặc luộc bằng nước cất 2 lần x 30 phút, sau đó đổ hết nước, rồi để khô.

Quần áo, khẩu trang hấp ẩm, sấy nhẹ ở nhiệt độ 60°C.

5.2. Tiến trình kỹ thuật nuôi cấy tế bào lympho máu ngoại vi để làm tiêu bản nhiễm sắc thể người

5.2.1. Chuẩn bị buồng cấy để nuôi cấy

- Lau chùi buồng cấy, bàn ghế, sàn nhà, tường của phòng cấy bằng dung dịch chloramin 1%.
- Bật đèn tím trước khi cấy 30 - 40 phút.
- Vệ sinh cá nhân theo nguyên tắc vô trùng.
- Các dụng cụ, hoá chất đã được xử lý theo nguyên tắc nuôi cấy, để đầy đủ trong buồng cấy.

5.2.2. Lấy máu để nuôi cấy

- Lấy máu tĩnh mạch 1 - 4ml cho vào ống trắng heparin (100 NE/ml).
- Nếu dùng huyết thanh tự thân có thể lấy 8ml - 10ml (lượng máu này cho vào một lọ trắng heparin hoặc cho vào 2 ống (một ống gồm 2ml có trắng heparin dùng để cấy; một ống gồm 8 - 10 ml không có heparin để lấy huyết thanh).

5.2.3. Một số phương pháp nuôi cấy có thể áp dụng

Nuôi cấy theo phương pháp Lejeune (1965)

1 lọ cấy gồm:

- 6ml môi trường, 2ml huyết thanh.
- 0,3 - 0,5ml máu toàn phần.
- 0,1ml dung dịch PHA.

Nuôi cấy theo phương pháp Moorhead (1960)

1 lọ cấy gồm:

- 6 - 8ml môi trường.
- 2 - 2,5ml huyết thanh.
- 0,5ml dịch huyết tương có bạch cầu.
- 0,1ml dung dịch PHA.

Phương pháp nuôi cấy trong bơm tiêm

Phương pháp này thích hợp với điều kiện đi thực địa.

- Một bơm tiêm thể tích 10ml tráng heparin, lấy 0,2 - 0,5ml máu tĩnh mạch, về phòng thí nghiệm bổ sung 4ml môi trường + 1ml huyết thanh và 0,1ml dung dịch PHA.
- Người ta có thể dùng picoll paque hoặc các hoá chất khác để tách riêng bạch cầu để nuôi cấy.
- Đặt lọ cấy vào tủ ấm $37^{\circ}\text{C} \times 72\text{giờ}$, trong quá trình cấy có thể lắc nhẹ để tránh hiện tượng đông vón hồng cầu.

5.3. Tiến trình thu hoạch tế bào nuôi cấy và làm tiêu bản nhuộm sắc thể

Đối với kỹ thuật làm tiêu bản thực tập, thu hoạch vào giờ thứ 72:

- Trước khi thu hoạch 2 giờ (giờ thứ 70) cho Colcemid nồng độ 0,1 microgam/ml (cho 2 giọt dung dịch colcemid vào 1 lọ cấy).
 - Ly tâm 800 - 1000 vòng/phút x 10 - 15 phút, giữ lại cặn chứa tế bào (khoảng 2ml).
 - Nhược trương bằng KCl 0,075M ở nhiệt độ $37^{\circ}\text{C} \times 30\text{ phút}$.
 - Ly tâm: 800 vòng/phút, giữ lại cặn có tế bào (khoảng 2ml/phút).
 - Cố định bằng Carnoy lạnh (3 methanol : 1 acid acetic): 1 ống ly tâm bổ sung khoảng 4 - 6ml Carnoy, cho từ từ, trộn kỹ. Ly tâm 800 vòng/phút x 10 phút, giữ lại cặn tế bào. Cố định như vậy từ 3 - 6 lần. Từ lần thứ 2 trở đi có thể để qua đêm. Ống để qua đêm phải bổ sung đầy đủ dung dịch Carnoy và bịt kín miệng ống.
 - Nhỏ tiêu bản: Chuẩn bị lam kính sạch không mỡ, không xước (các phiến kính này đã được xử lý bởi NaOH 1N x 24giờ, HCl 1% x 24giờ và ngâm trong cồn 90° x 24 giờ). Các lam kính để lạnh 1 - 2 giờ trước khi nhỏ tiêu bản
- + Ly tâm lần cuối để lại 0,5ml cặn.

- + Nhỏ tiêu bản.
- + Để khô tự nhiên.
- + Nhuộm Giêmsa (tỷ lệ 20%) x 30 phút hoặc nhuộm Giêmsa (5%) trong dung dịch đệm phosphat x 15 phút.
- + Để khô tự nhiên.
- + Gắn tiêu bản bằng bôm Canada.

Các dung dịch cần chuẩn bị

- KH_2PO_4 9,1g + nước cất vừa đủ 1000ml.
- Na_2HPO_4 11,9g + nước cất vừa đủ 1000ml.

Pha dung dịch đệm phosphat theo tỷ lệ: Na_2HPO_4 : 49,2ml.

KH_2PO_4 : 50,8ml.

- Giêmsa mẹ.

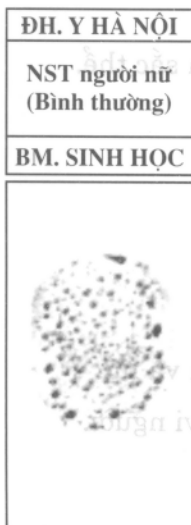
Pha dung dịch Giêmsa tỷ lệ 20% (2ml Giêmsa mẹ + 8ml nước cất).

Pha dung dịch Giêmsa 5% trong dung dịch đệm phosphat với tỷ lệ:

Na_2HPO_4 : 47,5ml

KH_2PO_4 : 47,5ml

Giêmsa: 5ml



Hình 3. 2. Tiêu bản NST - Hình ảnh NST người ở kỳ giữa

6. ĐÁNH GIÁ KẾT QUẢ THỰC HÀNH

Đưa vào đầu que chỉ một nhiễm sắc thể tâm giữa (hoặc tâm lệch, tâm đầu) ở vật kính x 40 trên tiêu bản nhiễm sắc thể mà mình tự tay nhỏ tiêu bản và nhuộm.

Bài 4

PHƯƠNG PHÁP XẾP BỘ NHIỄM SẮC THỂ NGƯỜI (LẬP KARYOTYP NGƯỜI)

1. MỤC TIÊU

- Xếp xong một bộ nhiễm sắc thể người theo quy ước quốc tế, viết công thức karyotyp và kết luận.
- Quan sát được cụm nhiễm sắc thể kỳ giữa của người ở vật kính x 40.
- Đếm số lượng và phân biệt các dạng nhiễm sắc thể tâm giữa, tâm lệch và tâm đầu.

2. PHƯƠNG PHÁP HỌC

- Học trước phần lý thuyết về phương pháp tế bào di truyền học và đặc điểm bộ nhiễm sắc thể người.
- Đọc trước bài thực tập để nắm vững cách xếp bộ nhiễm sắc thể.
- Quan sát các tiêu bản và hình triển lãm.

3. PHƯƠNG TIỆN DỤNG CỤ

3.1. Cho mỗi bàn 2 sinh viên

- 2 lọ hồ dán, hộp petri.
- 2 bản in các cụm nhiễm sắc thể kỳ giữa của người nam và nữ.
- 2 tiêu bản nhiễm sắc thể bạch cầu lympho máu ngoại vi người.

3.2. Cho cả tổ sinh viên

- Tranh cụm nhiễm sắc thể của người nam và karyotyp.
- Tranh cụm nhiễm sắc thể của người nữ và karyotyp.
- 2 karyotyp mẫu của người nam và nữ bình thường.
- Cụm nhiễm sắc thể kỳ giữa dưới vật kính dầu.

4. CÂU HỎI LÝ THUYẾT

1. Trình bày những tiêu chuẩn để xếp bộ nhiễm sắc thể người?
2. Trình bày đặc điểm nhiễm sắc thể nhóm A của người (nhóm B, C, D, E, F, G)?

5. NỘI DUNG

5.1. Quan sát cụm nhiễm sắc thể người bình thường

5.1.1. Cách làm tiêu bản

Bình thường tế bào bạch cầu lympho máu ngoại vi không phân chia, khi nuôi cấy trong môi trường và nhiệt độ thích hợp có sự kích thích của PHA (phytohemagglutinin), bạch cầu lympho chuyển dạng và phân chia, sau 70 giờ nuôi cấy, bổ sung Colcemid làm cho sự phân bào dừng lại ở kỳ giữa. Thu hoạch các tế bào ở giờ thứ 72. Sau các bước xử lý với dung dịch nhuộm trương và định hình, các cụm nhiễm sắc thể và nhân tế bào được phân tán đều lên phiến kính, nhuộm bằng Giemsa.

5.1.2. Quan sát

Ở vật kính x 10: Di chuyển tiêu bản tìm cụm nhiễm sắc thể kỳ giữa có các nhiễm sắc thể phân tán đều. Trên tiêu bản thấy các nhân bạch cầu bé hơn, màu tím đỏ là nhân của những tế bào chưa chuyển dạng và các nhân lớn hơn là nhân của các tế bào đã chuyển dạng. Xen vào đó có các cụm nhiễm sắc thể ở kỳ giữa, tìm những cụm có nhiễm sắc thể phân tán đều và đẹp.

Ở vật kính x 40: Quan sát hình dạng nhiễm sắc thể và chú ý phân biệt được các loại nhiễm sắc thể tâm giữa, tâm lệch và tâm đầu. Có thể đếm số lượng nhiễm sắc thể trong cụm (46 nhiễm sắc thể).

Chú ý: Xem hình ảnh triển lãm cụm nhiễm sắc thể ở vật kính đầu.

5.2. Xếp bộ nhiễm sắc thể người bình thường

5.2.1. Tiêu chuẩn xếp loại bộ nhiễm sắc thể người

Dựa vào tiêu chuẩn chiều dài tương đối của nhiễm sắc thể, vị trí phân tâm, nhiễm sắc thể, có hay không có eo thắt thứ hai, có hay không có vệ tinh, 46 nhiễm sắc thể của người được xếp thành 23 cặp, chia thành 7 nhóm theo kích thước giảm dần.

- *Nhóm I (nhóm A):* Gồm 3 cặp nhiễm sắc thể số 1, 2, 3, là các nhiễm sắc thể có kích thước lớn nhất, nhiễm sắc thể số 1 và 3 có tâm giữa, nhiễm sắc thể số 2 có tâm gần giữa. Nhiễm sắc thể số 1 có thể có thêm eo thắt thứ hai ở nhánh dài gần tâm.
- *Nhóm II (nhóm B):* Gồm 2 cặp nhiễm sắc thể số 4, số 5 là các nhiễm sắc thể có kích thước lớn và có tâm gần đầu và khó phân biệt nhau bằng kích thước.
- *Nhóm III (nhóm C):* Gồm 7 cặp nhiễm sắc thể là nhiễm sắc thể số 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12. Các nhiễm sắc thể này có kích thước trung bình, tâm gần giữa. Trong đó các nhiễm sắc thể số 6, 7, 8, và 11 có tâm gần giữa hơn các nhiễm sắc thể số 9, 10, 12. Nhiễm sắc thể X giống nhiễm sắc thể số 6 và 7.

- *Nhóm IV (nhóm D):* Gồm 3 cặp nhiễm sắc thể số 13, 14, 15 là các nhiễm sắc thể có kích thước trung bình, tâm đầu. Các nhiễm sắc thể này khó phân biệt nhau về kích thước, có thể thấy vệ tinh ở nhánh ngắn.
- *Nhóm V (nhóm E):* Gồm 3 cặp nhiễm sắc thể số 16, 17, 18 là các cặp nhiễm sắc thể tương đối ngắn. Nhiễm sắc thể số 16 tâm hầu như ở giữa, nhiễm sắc thể số 17 tâm gần giữa nhưng lệch hơn nhiễm sắc thể số 16, nhiễm sắc thể 18 tâm gần đầu. Nhiễm sắc thể số 16 có thể có eo thắt thứ hai ở nhánh dài gần tâm.
- *Nhóm VI (nhóm F):* Gồm 2 cặp nhiễm sắc thể số 19, 20, là các nhiễm sắc thể ngắn, tâm gần giữa, khó phân biệt nhau bằng kích thước.
- *Nhóm VII (nhóm G):* Gồm 2 cặp nhiễm sắc thể số 21, 22, là các nhiễm sắc thể rất ngắn, tâm đầu. Nhiễm sắc thể Y có tâm đầu, hình dạng và kích thước tương tự như nhiễm sắc thể thể nhóm G nhưng hai nhánh dài khép gần nhau hơn và trên nhánh dài có eo thắt thứ hai nằm ở phần giữa nhánh dài.

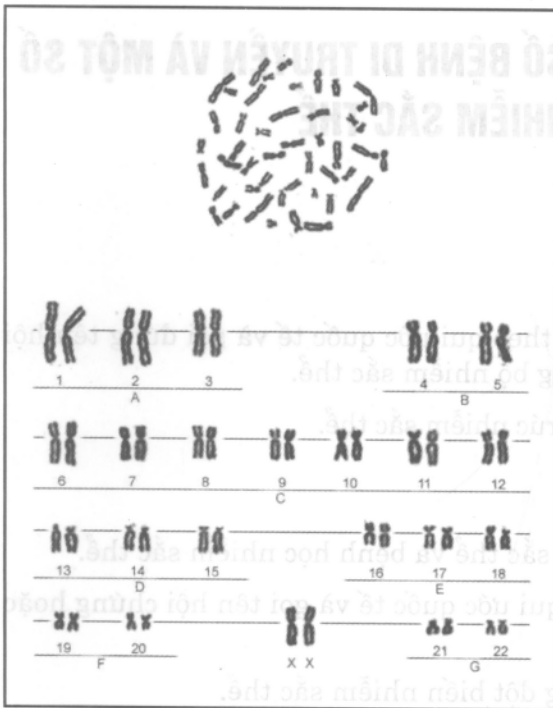
5.2.2. Các bước lập karyotyp

- Kẻ vào vở (hoặc giấy) 4 đường kẻ ngang cách nhau 4 dòng kẻ (dòng 1 và dòng 2 cách nhau rộng hơn).
 - Đếm số lượng nhiễm sắc thể trong cụm đã được in sẵn trên giấy.
 - Cắt rời từng chiếc nhiễm sắc thể.
 - Xếp sơ bộ các nhóm nhiễm sắc thể vào 4 đường kẻ theo thứ tự: Nhóm A, B đường kẻ 1, nhóm C đường kẻ 2, nhóm D, E đường kẻ 3, nhóm F, G và cặp nhiễm sắc thể giới tính đường kẻ 4. Xếp nhánh ngắn của nhiễm sắc thể quay lên trên.
- Lưu ý:* (Muốn xếp cho nhanh nên xếp các nhóm lần lượt theo thứ tự sau: A, B, D, G, E, F, C).
- Điều chỉnh các nhiễm sắc thể từng nhóm cho đúng.
 - Dán nhiễm sắc thể theo nhóm sao cho tâm vào đúng dòng kẻ.
 - Kết luận: Để kết luận, phải viết được số lượng nhiễm sắc thể và cặp nhiễm sắc thể giới tính, ngăn cách nhau bằng dấu phẩy; sau đó kết luận về tình trạng của bộ nhiễm sắc thể đó.

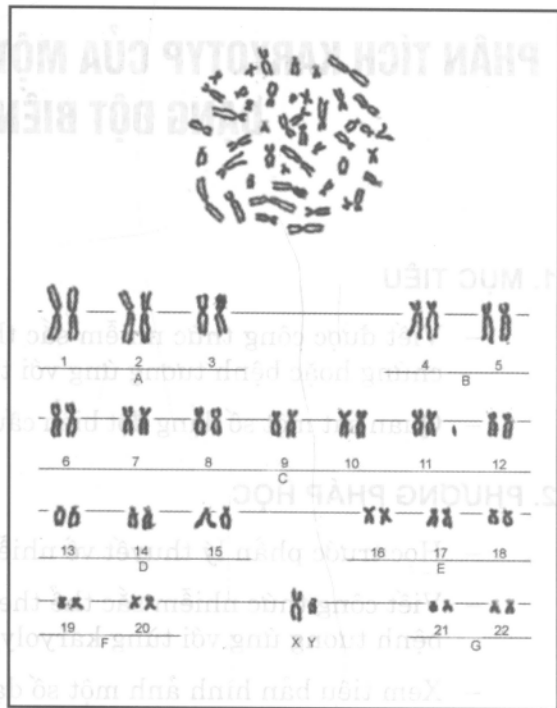
Vi dụ: 46,XX. Karyotyp người nữ bình thường.

6. ĐÁNH GIÁ KẾT QUẢ THỰC HÀNH

1. Đưa vào đầu que chỉ 1 cụm nhiễm sắc thể đẹp ở kỳ giữa ở vật kính x 40.
2. Trình bày bộ nhiễm sắc thể đã xếp.



Hình 4.1. 46,XX. Karyotyp người nữ bình thường



Hình 4.2. 46,XY. Karyotyp người nam bình thường

Bài 5

PHÂN TÍCH KARYOTYP CỦA MỘT SỐ BỆNH DI TRUYỀN VÀ MỘT SỐ DẠNG ĐỘT BIẾN NHIỄM SẮC THỂ

1. MỤC TIÊU

- Viết được công thức nhiễm sắc thể theo qui ước quốc tế và gọi đúng tên hội chứng hoặc bệnh tương ứng với từng bộ nhiễm sắc thể.
- Quan sát một số dạng đột biến cấu trúc nhiễm sắc thể.

2. PHƯƠNG PHÁP HỌC

- Học trước phần lý thuyết về nhiễm sắc thể và bệnh học nhiễm sắc thể.
- Viết công thức nhiễm sắc thể theo qui ước quốc tế và gọi tên hội chứng hoặc bệnh tương ứng với từng karyotyp.
- Xem tiêu bản hình ảnh một số dạng đột biến nhiễm sắc thể.

3. PHƯƠNG TIỆN DÙNG CỤ

3.1. Cho mỗi bàn 2 sinh viên

- 2 kính hiển vi quang học.
- 1 khay đựng hai tiêu bản có nhiễm sắc thể đột biến.

3.2. Cho cả tổ sinh viên

- Triển lãm hình ảnh trao đổi chromatid chị em (sister chromatid exchange-SCE).
- Hình ảnh nhiễm sắc thể chuyển đoạn (phương pháp nhuộm băng G).

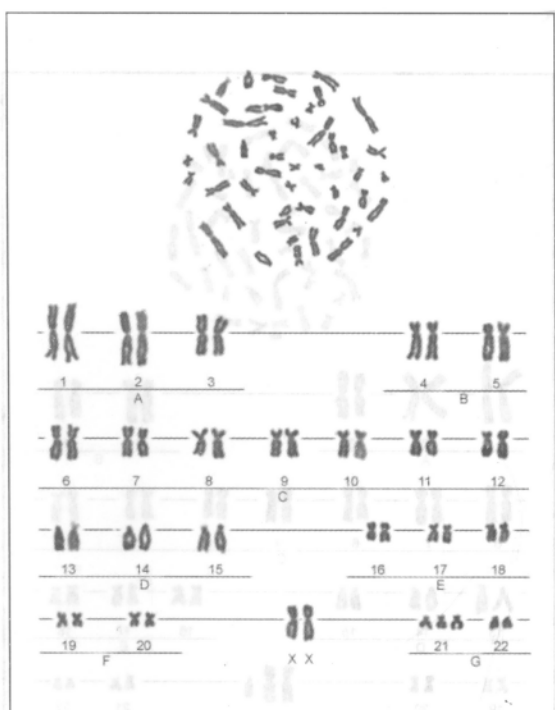
4. CÂU HỎI LÝ THUYẾT

Nêu cơ chế dẫn đến hiện tượng trao đổi chromatid chị em, nhiễm sắc thể hai tâm, nhiễm sắc thể hình vòng, chuyển đoạn nhiễm sắc thể?

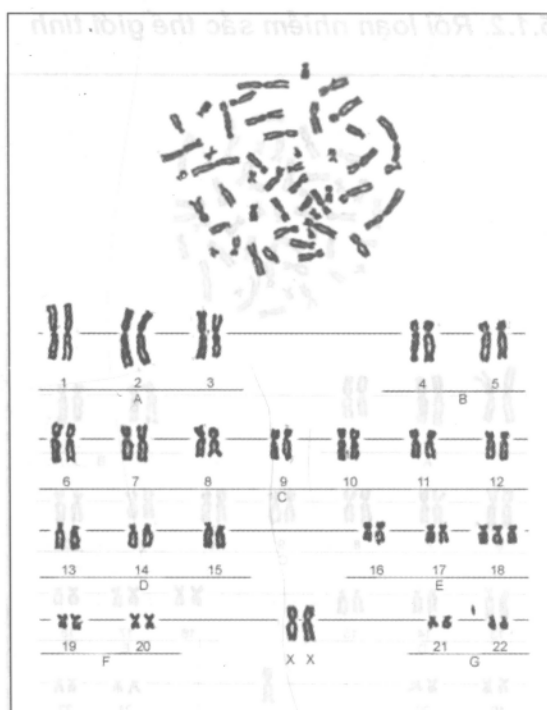
5. NỘI DUNG

5.1. Phân tích, đánh giá và kết luận về các bộ nhiễm sắc thể có rối loạn số lượng

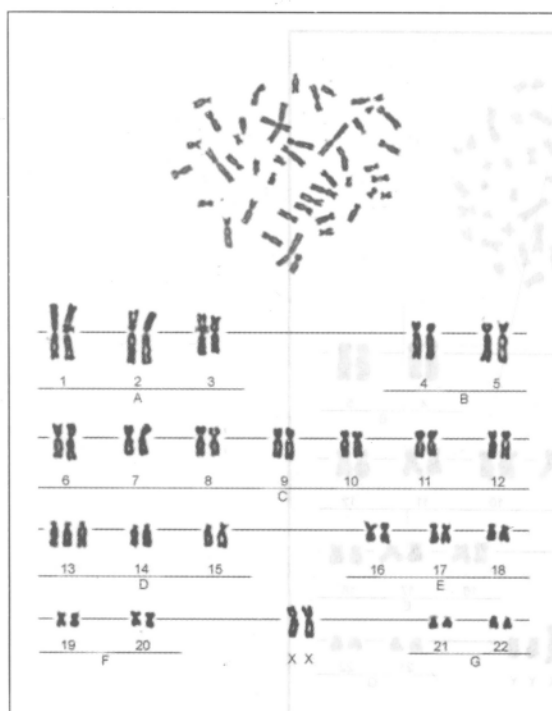
5.1.1. Rối loạn nhiễm sắc thể thường



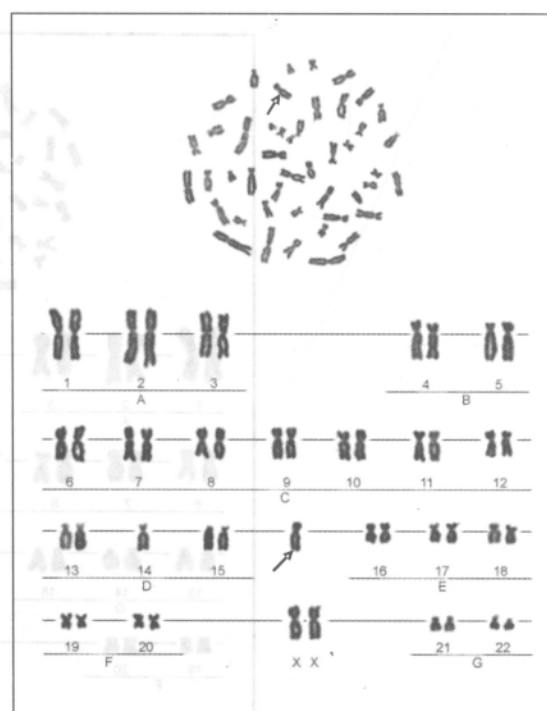
Hình 5.1. Karyotyp số 1



Hình 5.2. Karyotyp số 2

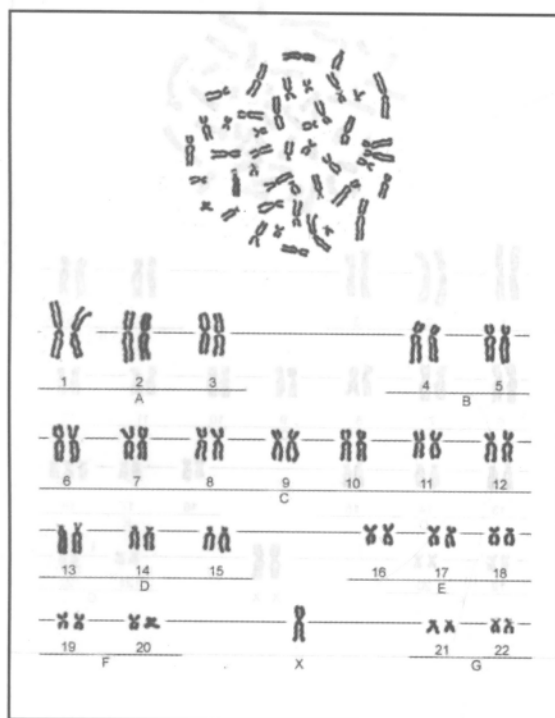


Hình 5.3. Karyotyp số 3

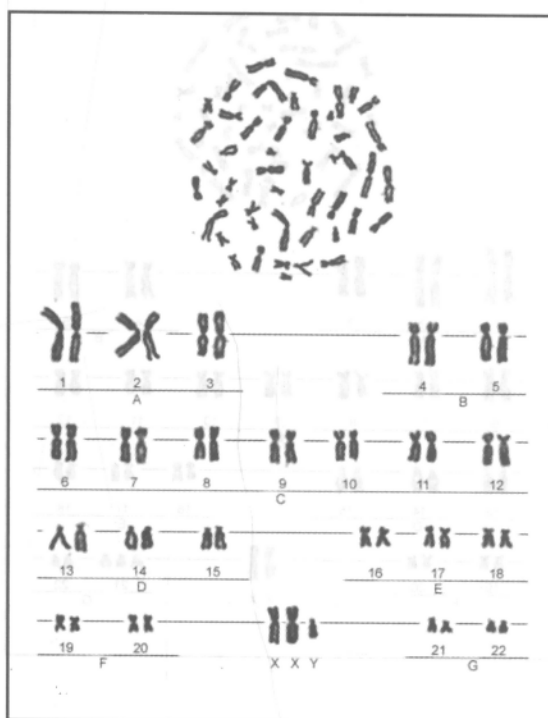


Hình 5.4. Karyotyp số 4

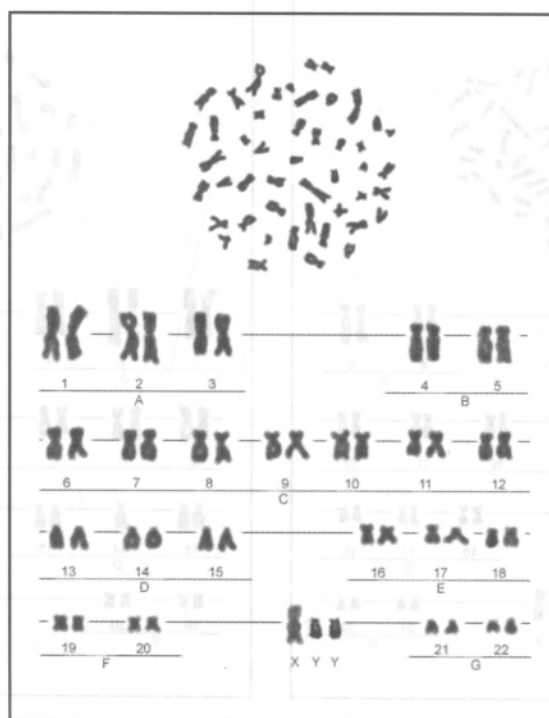
5.1.2. Rối loạn nhiễm sắc thể giới tính



Hình 5.5. Karyotyp số 5



Hình 5.6. Karyotyp số 6

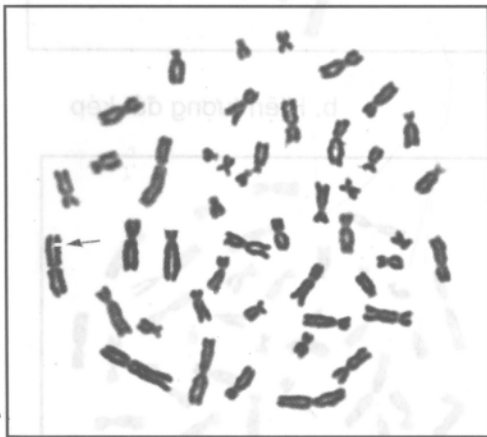


Hình 5.7. Karyotyp số 7

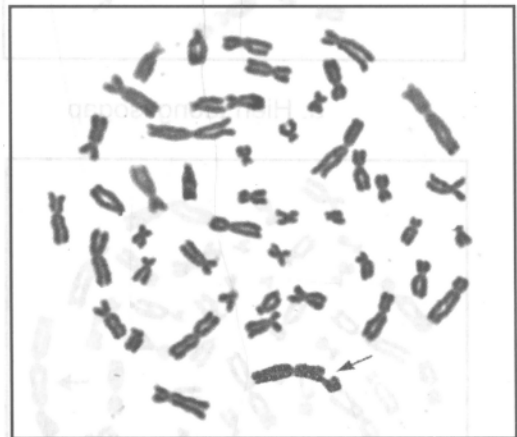
5.2. Quan sát một số dạng đột biến cấu trúc nhiễm sắc thể

5.2.1. Đột biến kiểu chromatid

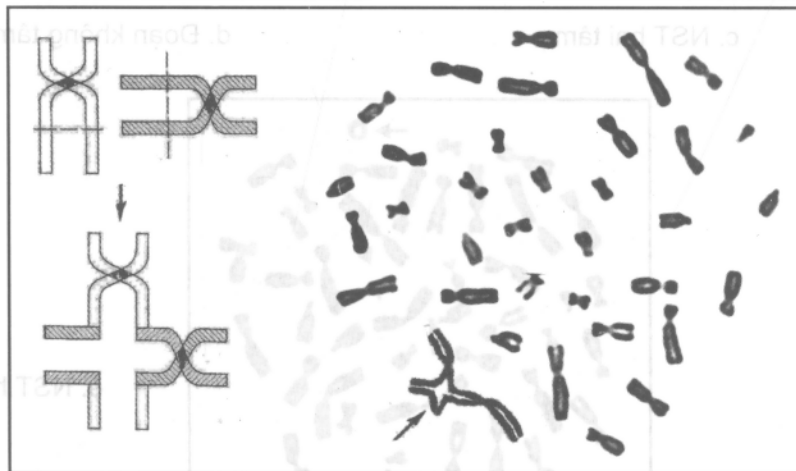
- Gap: Trên một chromatid có một chỗ không bắt màu và khoảng không bắt màu này không vượt quá đường kính của một chromatid.
- Đứt đơn: Trên một chromatid có một đoạn đứt rời ra, khoảng đứt này lớn hơn đường kính của một chromatid và lệch trục so với chromatid.
- Trao đổi chromatid: Các chromatid của các nhiễm sắc thể khác nhau bị đứt ra và nối lại với nhau tạo nên các hình ảnh ba cánh hoặc bốn cánh.



a. Hiện tượng gap



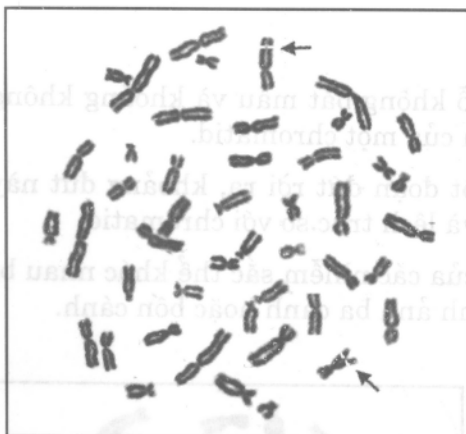
b. Hiện tượng đứt đơn



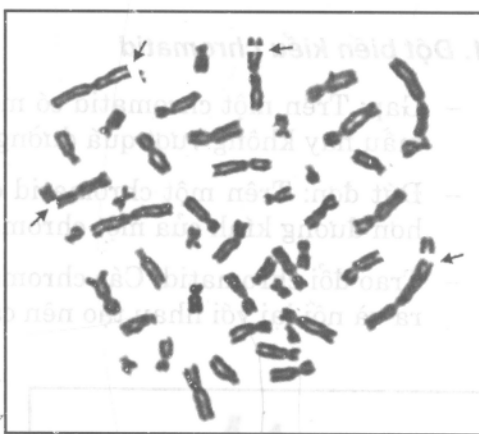
c. Hiện tượng trao đổi chromatid

Hình 5.8. Hiện tượng gap (a), đứt đơn (b), trao đổi chromatid (c)

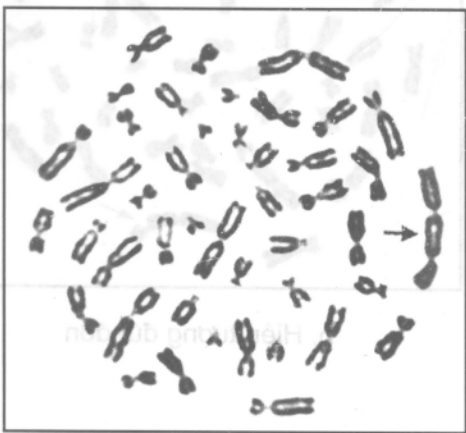
5.2.2. Đột biến kiểu nhiễm sắc thể



a. Hiện tượng isogap



b. Hiện tượng đứt kép



c. NST hai tâm



d. Đoạn không tâm



e. NST hình vòng

Hình 5.9. Hình ảnh isogap (a), đứt kép (b), nhiễm sắc thể hai tâm (c), đoạn không tâm (d), nhiễm sắc thể hình vòng (e).

- Isogap: Hiện tượng gap xảy ra trên hai chromatid ở vị trí tương ứng
- Đứt kép: Hiện tượng đứt xảy ra ở hai chromatid ở vị trí tương ứng.
- Nhiễm sắc thể hai tâm: Hiện tượng đứt xảy ra ở cả hai nhiễm sắc thể, phần còn lại có tâm của hai nhiễm sắc thể này nối lại với nhau.
- Đoạn không tâm: Hiện tượng đứt nhiễm sắc thể và đoạn đứt không tâm rời xa nhiễm sắc thể.
- Nhiễm sắc thể hình vòng: Nhiễm sắc thể bị đứt, phần còn lại có thể nối với nhau tạo nên nhiễm sắc thể hình vòng có tâm hoặc không tâm.

6. ĐÁNH GIÁ KẾT QUẢ THỰC HÀNH

1. Viết công thức nhiễm sắc thể của 7 karyotyp: Xác định tên hội chứng hoặc tên bệnh tương ứng với từng karyotyp.
2. Đưa vào đầu que chỉ hình ảnh một loại đột biến cấu trúc nhiễm sắc thể: loại đột biến kiểu chromatid hoặc đột biến kiểu nhiễm sắc thể.

Bài 6

MỘT SỐ KỸ THUẬT SINH HỌC PHÂN TỬ THÔNG DỤNG ỨNG DỤNG TRONG Y HỌC

1. MỤC TIÊU

- Trình bày được nguyên lý tách chiết ADN và tiến trình kỹ thuật tách chiết ADN từ bạch cầu máu ngoại vi.
- Trình bày được nguyên lý và tiến trình kỹ thuật nhân đoạn ADN invitro PCR (Polymerase Chain Reaction).
- Nêu được những ứng dụng của kỹ thuật sinh học phân tử trong y học và đời sống.

2. PHƯƠNG PHÁP HỌC

- Học trước phần lý thuyết về nguyên lý và tiến trình kỹ thuật tách chiết ADN; nguyên lý và tiến trình kỹ thuật PCR.
- Quan sát việc thực hiện tiến trình kỹ thuật tách chiết ADN và kỹ thuật PCR.
- Quan sát hình ảnh điện di ADN sau khi tách chiết ADN và hình ảnh điện di sản phẩm của PCR.

3. PHƯƠNG TIỆN DÙNG CỤ

Cho cả tổ sinh viên

3.1. Trang thiết bị

- Máy ly tâm thông thường trong phòng thí nghiệm với ống ly tâm (5 - 100ml) hoặc ly tâm ống nhỏ (0,5 - 2 μ l). Máy ly tâm lạnh.
- Tủ ấm.
- Bình cách thủy, tốt nhất là bình có lắc.
- Tủ lạnh từ 4°C đến - 20°C hoặc - 80°C: tùy mức độ bảo quản mẫu, có thể bảo quản ADN trong nitơ lỏng với thời gian dài hàng chục năm.
- Tủ ấm 37°C.
- Máy đo pH.
- Máy lắc.

- Máy sấy khô, hấp ảm (tiệt trùng).
- Máy điện di.
- Thiết bị soi tử ngoại.
- Cân: có thể cân được g, mg.
- Micropipet các loại: 0,5 - 100 μ l.
20 - 100 μ l.
200 - 1000 μ l.
- Các loại đầu tip cho micropipet.
- Ống Eppendorf.
- Các loại ống đong.
- Các loại dụng cụ thông thường của phòng xét nghiệm sinh hoá như chai, cốc...
- Giấy thiếc, giấy chỉ thị cho hấp vô trùng.

3.2. Hoá chất

- | | |
|--------------------------------------|----------------------|
| - EDTA (Ethylen Diamin Tetra Acetic) | - Acid boric. |
| - NH_4HCO_3 . | - Ethanol tuyệt đối. |
| - Tris - HCl. | - Glycerol. |
| - Tris base. | - Xanh bromophenol. |
| - NaCl. | - Ethidium bromid. |
| - SDS (Natri Dodecyl Sulfat). | - Proteinase K. |
| - Natri azid. | - ADN marker. |
| | - Agarose. |

Từ các hoá chất này pha thành các dung dịch đệm cần thiết:

- | | |
|---------------------|--------------------------------|
| - EDTA 0,4 M | - Đệm phá hồng cầu: |
| - Tris - HCl 2M | 1mM N_4HCO_3 |
| - MgCl_2 . | 115 mM NH_4Cl |
| - NaCl 3M. | - Đệm phá bạch cầu: |
| - NaCl 6M. | 100 mM Tris - HCl. |
| - SDS 10%. | 40mM EDTA. |
| - TE 10mM. | 50 mM NaCl. |
| | 0,2% SDS |
| | 0,05% Natri azid |
| | - Đệm TBE 5 x |
| | - Proteinase K 1mg/500 μ l |

Trang thiết bị cơ bản của phòng thí nghiệm sinh học phân tử: Máy PCR (máy nhân ADN), máy tủ ngoại soi ADN



MÁY PCR VÀ ỐNG EPPENDORF ĐỂ CHẠY PCR



KÍNH HIỂN VI QUANG HỌC VÀ BỘ CHỤP ẢNH NST



MÁY LI TÂM SIÊU TỐC

Hình 6.1. Minh hoạ một vài trang thiết bị cơ bản của phòng thí nghiệm

4. CÂU HỎI LÝ THUYẾT

1. Trình bày nguyên lý của kỹ thuật tách chiết ADN.
2. Trình bày nguyên lý của kỹ thuật điện di ADN.
3. Trình bày nguyên lý của kỹ thuật nhân đoạn ADN invitro (PCR).

5. NỘI DUNG

5.1. Kỹ thuật tách chiết ADN

5.1.1. Nguyên lý của kỹ thuật tách chiết ADN

Nguyên liệu cho tách chiết ADN là các tế bào có chứa ADN. Ta có thể tách ADN tổng số hoặc tách ADN của tế bào chất riêng. Tế bào có thể dưới dạng tươi, sống hoặc đã chết... Màng tế bào được phá vỡ bằng biện pháp cơ học hoặc hoá học (dùng chất

tấy mạnh). Dùng các chất proteinase K để phân huỷ protein, có thể dùng ARNase để phá huỷ ARN. Dùng các chất phenol, ethanol, isopropanol... để rửa ADN.

ADN được tách không có chiều dài như ban đầu mà thường bị gãy, thường có độ dài 20 Kb đến 200 Kb. Bộ gen bị gãy ở những đoạn khác nhau, nên có đủ đại diện các gen của bộ gen. Tuy thế nếu ADN bị gãy nhiều quá, quá ngắn có thể hạn chế kết quả nghiên cứu tiếp theo.

Để tách ADN từ máu ngoại vi:

- Dùng các dung dịch phá vỡ hồng cầu để tách riêng bạch cầu.
- Phá vỡ màng tế bào, màng nhân bạch cầu, ADN được giải phóng cùng các chất khác: protein... Ở giai đoạn này cần có những chất ức chế hoạt động enzym nuclease, vì vậy người ta thường hay dùng EDTA (Ethylen Diamin Tetra Acetic) làm cho nuclease mất hoạt tính để ADN không bị phá huỷ. Các dung dịch phá vỡ màng tế bào thường dùng SDS, tiếp theo dùng proteinase K để phân huỷ phần lớn protein trong dịch chiết. Bên cạnh đó người ta có thể loại riêng ARN bằng cách dùng ribonuclease, chủ yếu phân huỷ ARN.
- Người ta hay dùng muối Na trước khi làm rửa ADN; rửa ADN với ethanol tuyệt đối lạnh tỷ lệ gấp 2 lần dịch chứa ADN hoặc isopropanol lạnh tỷ lệ 1:1.
- Với lượng ADN lớn có thể thấy ADN rửa dưới dạng "Con sứa" lơ lửng.
- Lấy ADN bằng dụng cụ thuỷ tinh.
- Làm khô ADN ở nhiệt độ phòng.
- ADN có thể bảo quản dưới dạng rửa khô - 20°C hoặc để trong dung dịch nước cất khử ion hay TE (Tris - HCl 0,01M; EDTA 0,001M) pH 8.
- Kiểm tra độ tinh khiết ADN: Dựa vào việc xác định tỷ lệ OD (Optical Density). Phổ hấp thụ cực đại của ADN tại bước sóng 260nm, protein 280nm; polysaccharid 230 nm. Nếu tỷ lệ:

$$\frac{OD_{260}}{OD_{280}} \quad \text{và} \quad \frac{OD_{260}}{OD_{230}} = 1,7 - 2 \quad \text{thì ADN được coi là sạch}$$

Với phương pháp này cho phép phát hiện dịch chứa ADN có lẫn protein hay polysaccharid hay không.

Kiểm tra ADN bằng phương pháp điện di cho phép xác định có ADN không, có bị lẫn ARN không, ADN có bị gãy nhiều không.

Nguyên lý:

- Ở pH ≥ 8 , ADN mang điện âm, dưới tác dụng của dòng điện nó di chuyển về cực dương, tùy theo kích thước mà các đoạn ADN dài ngắn sẽ di chuyển với tốc độ khác nhau, thường điện di với agarose gel.

- Nhuộm ADN bằng ethidium bromid; dưới ánh sáng tử ngoại ADN gắn với ethidium bromid sẽ phát sáng. Qua hình ảnh điện di ta có thể biết được mẫu tách chiết có ADN? Hình ảnh điện di ADN là một vệt đậm, to nhỏ tùy lượng ADN. Nếu ADN bị đứt gãy nhiều và chưa sạch thì hình ảnh điện di gồm một dải băng không tạo thành một băng gọn.

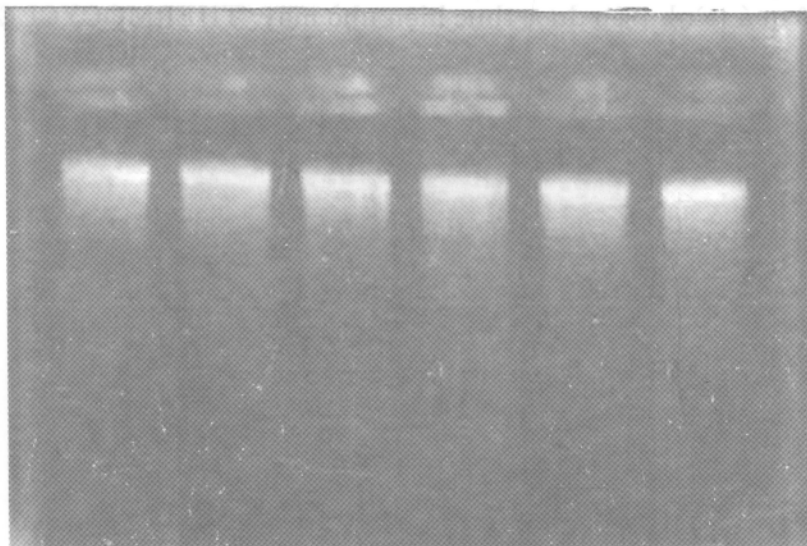
Chú ý: ethidium bromid là hoá chất có khả năng gây ung thư. Vì vậy khi làm việc phải đeo găng tay và thực hiện các quy định bảo vệ của phòng thí nghiệm.

Dựa vào nguyên lý trên có nhiều quy trình tách chiết ADN từ máu ngoại vi. Ở đây chỉ giới thiệu một vài quy trình tách chiết ADN từ máu ngoại vi được áp dụng ở Bộ môn Y sinh học - Di truyền.

5.1.2. Quy trình tách chiết ADN

- Lấy máu tĩnh mạch cho vào ống đã có sẵn EDTA 0.4M, trộn đều để máu không đông. Mẫu máu được bảo quản ở 4°C cho tới lúc tiến hành kỹ thuật.
- Cho 5 ml dung dịch đệm phá hồng cầu vào ống máu trộn nhiều lần, ly tâm 2500 vòng/phút trong 10 phút. Bỏ dịch nổi, giữ lại cặn tủa tế bào màu trắng. Mục đích chủ yếu là để phá huỷ hồng cầu, tách riêng bạch cầu. Có thể làm nhiều lần cho đến khi cặn tế bào có màu trắng sạch.
- Làm tan cặn tủa bằng cách dùng máy lắc.
- Cho tiếp vào ống chứa cặn tủa tế bào 900µl đệm phá bạch cầu, phá vỡ tế bào bằng máy lắc trong 5 phút. Sản phẩm có thể dùng tách chiết tiếp ADN hoặc bảo quản ở 4°C trong vài tuần.
- Cho thêm vào ống 0,1 mg proteinase K lắc đều bằng máy lắc trong 5 phút.
- Ủ 50°C trong 2 giờ, 15 phút lắc một lần.
- Cho thêm 300 µl NaCl bão hoà 6M, lắc đều bằng máy lắc trong 5 - 10 phút.
- Ly tâm 2500 vòng/phút trong 10 phút.
- Loại bỏ cặn tủa protein, chuyển dịch nổi chứa ADN sang ống khác.
- Cho nhẹ nhàng ethanol tuyệt đối vào ống có dịch nổi chứa ADN, thể tích ethanol gấp 2 lần thể tích dịch nổi.
- Nghiêng ống nhẹ nhàng cho đến khi xuất hiện tủa ADN.
- Chuyển tủa sang ống Eppendorf đã có sẵn 200µl TE, lắc nhẹ.
- Để sản phẩm ở 37°C trong 2 - 3 giờ cho tới khi tủa ADN tan hoàn toàn.
- Kiểm tra chất lượng ADN bằng cách chạy điện di.
- Bảo quản ADN ở nhiệt độ 4°C, - 20°C hoặc - 80°C tùy thời gian cần giữ ADN ngắn hay dài.

5.1.3. Kiểm tra ADN sau khi tách chiết bằng phương pháp điện di (hình 6.2)



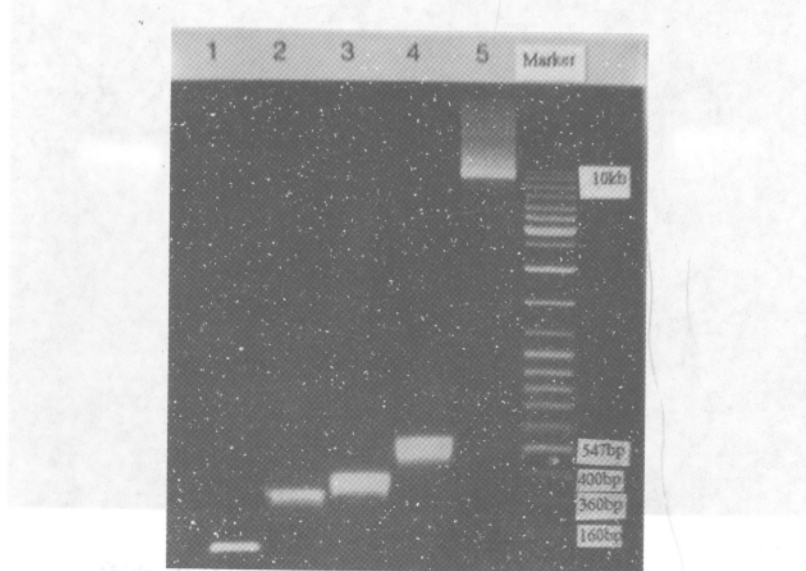
Hình 6.2. Hình ảnh điện di ADN sau khi tách chiết

5.2. Kỹ thuật nhân đoạn ADN (PCR)

- Mục đích: Từ một lượng ADN rất ít ban đầu, sau khi áp dụng phương pháp PCR sẽ có một lượng lớn ADN để sử dụng trong chẩn đoán, nghiên cứu.
- Các thành phần tham gia phản ứng.
 - + Enzym Taq polymerase
 - + 4 loại nucleotid đã được hoạt hoá (dNTPs)
 - + ADN mẫu (Primer)
 - + ADN khuôn (DNA template)
- Phản ứng PCR là một chuỗi nhiều chu kỳ nối tiếp nhau. Mỗi chu kỳ gồm 3 giai đoạn:
 - + Giai đoạn 1: Biến tính: nâng nhiệt độ lên 95°C. Ở nhiệt độ này tất cả các mạch xoắn kép của phân tử ADN khuôn đều được tách thành sợi đơn. Giai đoạn này thường từ 30 giây đến 1 phút.
 - + Giai đoạn 2: Gắn mẫu: hạ nhiệt độ xuống 52°C. Ở nhiệt độ này hai đoạn mẫu (mẫu xuôi, mẫu ngược) sẽ cặp đôi với hai sợi ADN theo hướng 5'- 3'. Giai đoạn này thường từ 30 giây - 1 phút
 - + Giai đoạn 3: Tổng hợp ADN: nâng nhiệt độ lên 72°C, ở nhiệt độ này ADN Taq polymerase hoạt động để kéo dài các mạch ADN. Nguyên liệu ở đây là 4 loại dNTP. Thời gian tùy thuộc độ dài của trình tự ADN, thường từ 30 giây đến nhiều phút.

- Cứ sau một chu kỳ gồm ba giai đoạn như trên một ADN khuôn được nhân thành hai. Sau khoảng 30 chu kỳ thì từ một phân tử ADN khuôn ban đầu có thể tạo ra một số lượng ADN gấp 2^{30} lần.

Toàn bộ quá trình trên được thực hiện nhờ máy “THERMOCYCLER” tự động.



Hình 6.3. Hình ảnh điện di ADN sau khi chạy PCR

6. ĐÁNH GIÁ KẾT QUẢ THỰC HÀNH

1. Nhận xét kết quả điện di ADN.
2. Ứng dụng kỹ thuật tách chiết ADN, kỹ thuật PCR trong y học và đời sống.

Bài 7

PHƯƠNG PHÁP CON SINH ĐÔI, DI TRUYỀN QUẦN THỂ, DI TRUYỀN SINH HOÁ

1. MỤC TIÊU

- Sử dụng được các công thức để tính hệ số sinh đôi một hợp tử, hai hợp tử, độ di truyền và kết luận.
- Tính được tần số kiểu hình, tần số gen dựa trên số liệu điều tra quần thể.
- Phân biệt được hình ảnh điện di hemoglobin (Hb) người bình thường, người bệnh và quan sát hồng cầu người mắc bệnh hemoglobin.

2. PHƯƠNG PHÁP HỌC

- Học trước lý thuyết về phương pháp con sinh đôi, định luật Hardy - Weinberg, bệnh học hemoglobin (Hb).
- Tại phòng thực tập:
 - + Tính hệ số con sinh đôi các loại, độ di truyền và rút ra kết luận về tính di truyền của bệnh.
 - + Quan sát so sánh hệ số sinh đa phôi một hợp tử và sinh đa phôi khác hợp tử ở một số chủng tộc khác nhau.
 - + Phải tính được tần số các loại kiểu hình, tần số các loại gen.
 - + Quan sát các mẫu điện di đã làm sẵn: Hb người bình thường và Hb người bệnh.
 - + Quan sát hồng cầu người bệnh Hb.

3. PHƯƠNG TIỆN DỤNG CỤ

3.1. Mỗi sinh viên nên chuẩn bị một máy tính cầm tay

3.2. Cho cả tổ sinh viên

- Các bảng về các số liệu điều tra quần thể các cặp con sinh đôi với một số bệnh.
- Bảng các công thức dùng trong nghiên cứu con sinh đôi.
- Các mẫu điện di Hb người bình thường và người bệnh.
- Tiêu bản hồng cầu người mắc bệnh beta thalassemia.

4. CÂU HỎI LÝ THUYẾT

1. Phương pháp nghiên cứu con sinh đôi có ứng dụng gì trong di truyền y học ?
2. Có mấy loại sinh đa phôi ở người? Bản chất và đặc điểm của từng loại sinh đa phôi?
3. Trong phương pháp con sinh đôi độ di truyền (H) được tính theo công thức nào? Ý nghĩa của độ di truyền (H)?
4. Nêu công thức Hardy - Weinberg và nói rõ từng thành phần trong công thức?
5. Trình bày nguyên nhân, cơ chế của bệnh thalassemia, HbC, HbE?

5. NỘI DUNG

5.1. Tính hệ số sinh đôi một hợp tử và sinh đôi hai hợp tử

5.1.1. Các hệ số sinh đôi một hợp tử và hai hợp tử ở từng quần thể được tính trên 1000 cá thể theo 2 công thức sau

- Hệ số sinh đôi một hợp tử (m) được tính theo công thức:

$$m = \frac{L \cdot 2U}{N} \times 1000$$

Trong đó: U là số cặp sinh đôi khác giới.

N là tổng số cá thể điều tra.

L là tổng số cặp sinh đôi trong nghiên cứu.

- Hệ số sinh đôi hai hợp tử (d) được tính theo công thức:

$$d = \frac{2U}{N} \times 1000$$

Trong đó: U là số cặp sinh đôi khác giới.

N là tổng số cá thể điều tra.

5.1.2. Bài toán

Trong một điều tra trên 10.910 trẻ sơ sinh đã gặp 114 cặp sinh đôi, trong đó 21 cặp khác giới, 50 cặp cùng giới nam và 43 cặp cùng giới nữ. Tính hệ số sinh đôi một hợp tử và hệ số sinh đôi hai hợp tử ở mẫu nghiên cứu này?

5.2. Tính độ di truyền (H) và ảnh hưởng của môi trường

Bài toán: Qua điều tra một số bệnh về tâm thần và tim mạch từ các cặp sinh đôi một hợp tử và sinh đôi hai hợp tử trong đó có những cặp sinh đôi tương hợp (cả hai cùng bị bệnh) và những cặp sinh đôi không tương hợp (một cá thể mắc bệnh,

còn cá thể kia không mắc bệnh) theo các số liệu của Harvald và CS (năm 1965) liệt kê dưới đây (Bảng 7.1).

Bảng 7.1. Số liệu điều tra về bệnh tâm thần và tim mạch từ các cặp sinh đôi một hợp tử và hai hợp tử

Bệnh và số cặp sinh đôi quan sát	Dạng sinh đôi	Sinh đôi một hợp tử	Sinh đôi hai hợp tử
Bệnh tâm thần phân liệt			
- Số cặp sinh đôi được khảo sát bệnh		9	33
- Số cặp sinh đôi mà cả hai cùng mắc		4	4
Bệnh loạn tâm thần thao cuồng trầm uất			
- Số cặp sinh đôi được khảo sát		15	23
- Số cặp sinh đôi mà cả hai cùng mắc		12	2
Thiếu năng trí tuệ			
- Số cặp sinh đôi được khảo sát bệnh		18	12
- Số cặp sinh đôi mà cả hai cùng mắc		12	0
Bệnh động kinh			
- Số cặp sinh đôi được khảo sát bệnh		27	43
- Số cặp sinh đôi mà cả hai cùng mắc		10	6
Tăng trương lực			
- Số cặp sinh đôi được khảo sát bệnh		80	106
- Số cặp sinh đôi mà cả hai cùng mắc		20	10
Nhồi máu các loại			
- Số cặp sinh đôi được khảo sát bệnh		102	155
- Số cặp sinh đôi mà cả hai cùng mắc		20	24
Cơn đột quỵ khởi phát cấp tính			
- Số cặp sinh đôi được khảo sát bệnh		98	148
- Số cặp sinh đôi mà cả hai cùng mắc		22	16

5.3. Tính độ di truyền (H) và ảnh hưởng của môi trường với một số dị tật hoặc bệnh di truyền đa nhân tố như liệt kê ở bảng 7.2.

Bảng 7.2. Các số liệu điều tra trong nghiên cứu con sinh đôi về một số dị tật hoặc bệnh di truyền đa nhân tố

Tật hoặc bệnh	Loại sinh đôi	Số cặp quan sát về bệnh	Số cặp tương hợp	
			n	%
Bàn chân vẹo vào trong	1 hợp tử	35	8	22,9%
	2 hợp tử	135	3	2,3%
Trật khớp háng bẩm sinh	1 hợp tử	29	12	41,4%
	2 hợp tử	109	3	2,8%
Sứt môi, nứt khẩu cái	1 hợp tử	125	37	29,6%
	2 hợp tử	236	11	4,7%
Ung thư	1 hợp tử	196	34	17,4%
	2 hợp tử	546	59	10,8%
Bệnh mạch vành tim	1 hợp tử	21	4	19%
	2 hợp tử	47	4	8,5%
Đái tháo đường	1 hợp tử	181	101	55,8%
	2 hợp tử	394	45	11,4%
Cường tuyến giáp	1 hợp tử	49	23	47%
	2 hợp tử	64	2	3,1%
Bệnh vẩy nến	1 hợp tử	31	19	61%
	2 hợp tử	46	6	13%
Bệnh sỏi mật	1 hợp tử	49	13	26,6%
	2 hợp tử	62	4	6,5%
Bệnh lao	1 hợp tử	381	202	51,6%
	2 hợp tử	843	187	22,2%
Bệnh sarcoid	1 hợp tử	4	2	50%
	2 hợp tử	11	1	8,5%

Dùng công thức Holzinger để tính độ di truyền:

Trường hợp các tính chất định tính:

$$\text{Độ di truyền (H)} = \frac{\frac{\% \text{ Số cặp sinh đôi một hợp tử tương hợp}}{\% \text{ Số cặp sinh đôi hai hợp tử tương hợp}} - \frac{\% \text{ Số cặp sinh đôi hai hợp tử tương hợp}}{\% \text{ Số cặp sinh đôi hai hợp tử tương hợp}}}{100\% - \% \text{ số cặp sinh đôi hai hợp tử tương hợp}}$$

Trường hợp các tính chất định lượng:

$$\text{Độ di truyền (H)} = \frac{\frac{\text{Số cặp sinh đôi hai hợp tử không tương hợp}}{\text{Số cặp sinh đôi một hợp tử không tương hợp}} - \frac{\text{Số cặp sinh đôi một hợp tử không tương hợp}}{\text{Số cặp sinh đôi hai hợp tử không tương hợp}}}{\text{Số cặp sinh đôi hai hợp tử không tương hợp}}$$

Ảnh hưởng của môi trường được tính theo công thức: $E = 100\% - H$ hoặc $E = 1 - H$; trong đó E là tác động của môi trường và (H) là độ di truyền.

- Nếu độ di truyền H từ 0 - 0,25 (E từ 1 - 0,75): Bệnh không có tính chất di truyền, chủ yếu do tác động của môi trường.
- Nếu độ di truyền H từ 0,25 - 0,5 (E từ 0,75 - 0,5): Bệnh có tính di truyền yếu, do tác động nhiều của môi trường.
- Nếu độ di truyền H từ 0,5 - 0,75 (E từ 0,5 - 0,25): Bệnh do di truyền mạnh, ít chịu tác động của môi trường.
- Nếu độ di truyền H từ 0,75 - 1 (E từ 0,25 - 0): Bệnh hoàn toàn do yếu tố di truyền quyết định, ít chịu tác động của môi trường.

5.4. Ứng dụng định luật Hardy - Weinberg

$$p^2 + 2pq + q^2 = 1$$

Trong đó: p^2 là tần số cá thể có genotyp AA.

q^2 là tần số cá thể có genotyp aa.

$2pq$ là tần số cá thể có genotyp Aa.

Bài toán: Điều tra 1000 cá thể trong quần thể thấy 490 cá thể có kiểu hình của trạng thái đồng hợp tử lặn, 510 cá thể biểu hiện kiểu hình của alen trội (A).

- Tính tần số alen a, alen A.
- Tính tần số người ở trạng thái dị hợp Aa.
- Tính tần số người ở trạng thái đồng hợp AA.

5.5. Tính tần số alen trong quần thể

Bài toán: Các locus chi phối các kiểu hemoglobin của một dân tộc ở châu Phi có các alen sau: β^A , β^S , β^C , β^D .

Điều tra 1000 người của dân tộc đó thấy :

- Hemoglobin bình thường (HbAHbA) 562 người
- Hemoglobin SS 6 người

- Hemoglobin CC	25 người
- Hemoglobin DD	0 người
- Hemoglobin AS	120 người
- Hemoglobin AC	242 người
- Hemoglobin SC	26 người
- Hemoglobin AD	14 người
- Hemoglobin DS	2 người
- Hemoglobin DC	3 người

Tính tần số alen β^A , β^S , β^C , β^D

5.6. Phương pháp điện di hemoglobin

5.6.1. Nguyên lý kỹ thuật điện di hemoglobin

Ở môi trường dung dịch đệm pH 8,5, phân tử Hb mang điện tích âm do đó chuyển động về phía cực dương của điện trường. Mỗi loại Hb có trọng lượng phân tử khác nhau nên có vận tốc chuyển động khác nhau, chuyển động nhanh hơn cả là các phân tử HbH rồi thứ tự đến HbI, Hb Bart. HbF có vận tốc chuyển động chậm hơn HbA₁ một chút, chậm hơn nữa là các phân tử HbD, HbS, HbO, cuối cùng là các phân tử HbA₂ (HbA₂ và HbE có tốc độ di chuyển giống nhau). Trên chất giá điện di các loại hemoglobin sau cùng không thể phân biệt được với nhau.

5.6.2. Các bước tiến hành điện di hemoglobin

- Chuẩn bị dịch hemoglobin (hemolysat).
- Chất giá để chạy điện di: băng cellogen.
- Trước khi chạy điện di, băng cellogen được ngâm trong dung dịch đệm, rồi vớt lên thấm bằng giấy thấm.
- Dùng bút chì đánh dấu vào nơi sẽ chấm mẫu hemoglobin cách mép băng cellogen từ 2 đến 3 cm.
- Chấm mẫu hemoglobin vào chỗ đã vạch sẵn bằng bút chì. Khi chạy điện di bao giờ cũng chạy một mẫu hemoglobin người bình thường để làm mẫu chứng bình thường so sánh với các mẫu hemoglobin người bệnh.
- Đặt băng cellogen vào máng điện di, điều chỉnh cường độ và thế hiệu của bộ nguồn máy điện di và thời gian cho phù hợp.
- Đủ thời gian lấy băng cellogen ra và nhuộm băng cellogen bằng dung dịch ponceau 2%. Tại vị trí có hemoglobin sẽ hiện lên các băng màu đậm nhạt khác nhau tùy tỷ lệ hemoglobin.

5.6.3. Hình ảnh điện di hemoglobin

5.6.3.1. Hemoglobin người bình thường

Ở người bình thường HbA₁ chiếm 97,5% tương đương với một băng đậm, HbA₂ khoảng 2% thể hiện là một băng rất mảnh bắt màu hồng nhạt chạy dưới HbF, còn lại là HbF khoảng 0,5% không thấy được bằng mắt thường trên hình ảnh điện di (Hình 7.1).

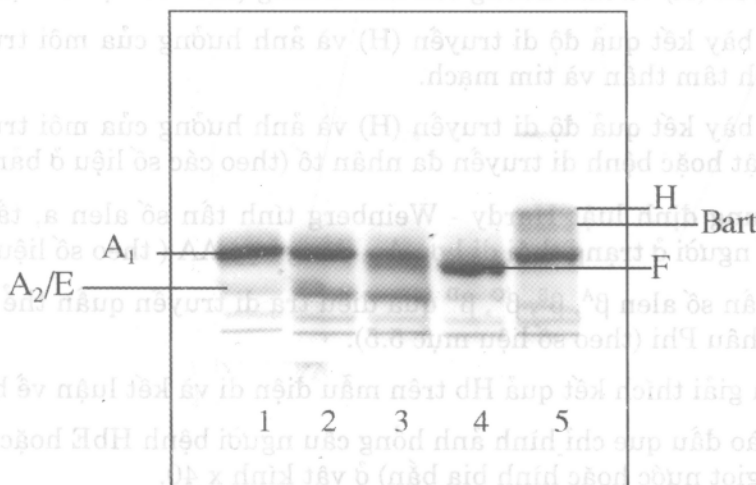
5.6.3.2 Hemoglobin người bệnh

Khi đọc kết quả hemoglobin người bệnh bao giờ cũng so sánh với hemoglobin người bình thường.

Bệnh hemoglobin do rối loạn chất lượng mạch globin

- Người bệnh dị hợp HbE gồm có HbA₁ và HbE (trên hình ảnh điện di thể hiện 2 băng HbA₁ và HbE, HbE ngang với vị trí với HbA₂ nhưng tỉ lệ cao hơn nên băng tương đối đậm hơn HbA₂ ở người bình thường).
- Người bệnh beta thalassemia
 - + Thể dị hợp tử kép β^0 thalassemia/HbE: Trên hình ảnh điện di thể hiện 2 băng HbF và HbE.
 - + Thể dị hợp tử kép β^+ thalassemia/HbE: Trên hình ảnh điện di thể hiện 3 băng HbA₁, HbF, HbE.
 - + Beta thalassemia thể nặng: Hình ảnh điện di có HbF và HbA₂
- Người bệnh dị hợp alpha thalassemia

Trên hình ảnh điện di có thể thấy HbH và HbBart là những băng bắt màu hồng chạy trước HbA₁ và có cả HbA₂.



Hình 7.1. Hình ảnh điện di hemoglobin bình thường và bệnh lý

Đường 1: HbA₁ và HbA₂;

Đường 2: HbA₁ và HbE;

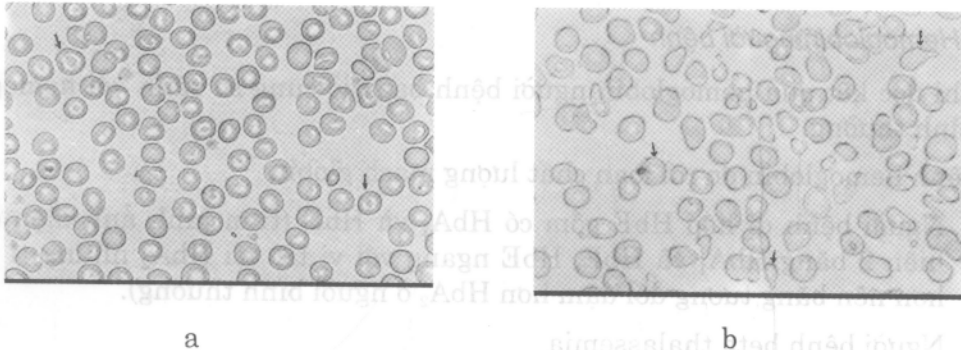
Đường 3: HbA₁ và HbF, HbE;

Đường 4: HbF và HbA₂;

Đường 5: HbH, HbBart1, HbA₁, HbA₂

5.7. Hình ảnh máu ngoại vi của người bệnh beta thalassemia

Ở người bình thường hồng cầu không bị biến dạng. Ở người bệnh HbE hoặc beta thalassemia bên cạnh các hồng cầu có hình thái bình thường, còn thấy các hồng cầu bị biến dạng có hình bia, hình giọt nước, hình nhẵn (hình chụp qua kính hiển vi giới thiệu một số dạng hồng cầu đỏ).



Hình 7.2. Hình chụp qua kính hiển vi một số dạng hồng cầu bệnh lý

a: Hồng cầu ở máu ngoại vi của người bệnh HbE: nhiều hồng cầu có hình bia bắn.

b: Hồng cầu ở máu ngoại vi của thể dị hợp tử kép β thalassemia/ HbE: nhiều hồng cầu hình bia bắn, hồng cầu hình giọt nước, hình nhẵn.

6. ĐÁNH GIÁ KẾT QUẢ THỰC HÀNH

1. Trình bày kết quả hệ số sinh đôi một hợp tử, hệ số sinh đôi hai hợp tử, độ di truyền (H) và ảnh hưởng của môi trường (theo số liệu ở mục 5.1).
2. Trình bày kết quả độ di truyền (H) và ảnh hưởng của môi trường với một số bệnh tâm thần và tim mạch.
3. Trình bày kết quả độ di truyền (H) và ảnh hưởng của môi trường với một số dị tật hoặc bệnh di truyền đa nhân tố (theo các số liệu ở bảng 7.2).
4. Ứng dụng định luật Hardy - Weinberg tính tần số alen a, tần số alen A, tần số người ở trạng thái dị hợp Aa, đồng hợp AA (theo số liệu ở mục 5.4).
5. Tính tần số alen β^A , β^S , β^C , β^D qua điều tra di truyền quần thể của một dân tộc ở châu Phi (theo số liệu mục 5.5).
6. Đọc và giải thích kết quả Hb trên mẫu điện di và kết luận về bệnh.
7. Đưa vào đầu que chỉ hình ảnh hồng cầu người bệnh HbE hoặc thalassemia (hình giọt nước hoặc hình bia bắn) ở vật kính x 40.

Bài 8

NGHIÊN CỨU CÁC BỆNH DI TRUYỀN ĐƠN GEN BẰNG PHƯƠNG PHÁP GIA HỆ

1. MỤC TIÊU

- Sử dụng được ký hiệu quốc tế để xây dựng được 3 gia hệ bệnh di truyền dựa trên các tình huống đã cho.
- Xác định được quy luật di truyền của các bệnh di truyền alen trội, di truyền alen lặn trên nhiễm sắc thể thường và bệnh liên kết trên nhiễm sắc thể X và nhiễm sắc thể Y qua phân tích các gia hệ đã được xây dựng.

2. PHƯƠNG PHÁP HỌC

- Học trước lý thuyết về ký hiệu xây dựng gia hệ theo hệ thống quốc tế, đặc điểm của các quy luật di truyền đơn gen, các bảng dự tính nguy cơ di truyền.
- Xây dựng 3 gia hệ bệnh di truyền với các tình huống đã cho.
- Phân tích các gia hệ bệnh di truyền, kết luận quy luật di truyền của bệnh ở từng gia hệ. Qua phân tích các đặc điểm di truyền, xác định người dị hợp tử và nguy cơ di truyền ở thế hệ sau.

3. PHƯƠNG TIỆN DÙNG CỤ

- Tranh các ký hiệu theo hệ thống quốc tế dùng để xây dựng gia hệ.
- Tranh của 3 gia hệ sinh viên phải lập theo tình huống đã cho (chữa cuối giờ học).
- Tranh của 7 gia hệ đã lập sẵn kèm theo kết luận về quy luật di truyền của bệnh trong gia hệ.

4. CÂU HỎI LÝ THUYẾT

1. Trình bày tóm tắt đặc điểm của bệnh di truyền alen trội nhiễm sắc thể thường.
2. Trình bày tóm tắt đặc điểm của bệnh di truyền alen lặn nhiễm sắc thể thường.
3. Trình bày tóm tắt đặc điểm của bệnh di truyền alen trội liên kết nhiễm sắc thể X không có alen tương ứng trên nhiễm sắc thể Y.

4. Nêu tóm tắt đặc điểm của bệnh di truyền alen lặn liên kết nhiễm sắc thể X không có alen tương ứng trên nhiễm sắc thể Y.
5. Nêu tóm tắt đặc điểm của bệnh di truyền liên kết trên nhiễm sắc thể Y không có alen tương ứng trên nhiễm sắc thể X.

5. NỘI DUNG

5.1. Dùng các ký hiệu quốc tế để xây dựng các gia hệ bệnh di truyền dựa trên các tình huống đã cho

5.1.1. Gia hệ 1

Xây dựng gia hệ của đương sự a là nam giới bị tật dính ngón 3 và ngón 4 của một bàn tay, dính ngón 2 và ngón 3 của một bàn chân, có lịch sử gia đình như sau:

- Đương sự a là con thứ năm của một gia đình có 6 chị em. Hai người chị gái đầu bình thường, không bị tật dính ngón. Người chị thứ ba bị dính ngón 3 và ngón 4 của bàn tay. Người chị thứ tư bị dính ngón 2 và ngón 3 của bàn chân; người em trai của đương sự (em út) bị dính ngón 3 và ngón 4 của bàn tay.
- Đương sự a có vợ bình thường, không bị tật dính ngón; cặp vợ chồng này có 4 người con. Người con trai cả bị tật dính ngón 3 và ngón 4 của bàn tay. Người con gái thứ hai và người con trai thứ ba bình thường, không bị tật dính ngón. Người con gái út bị tật dính ngón 3 và ngón 4 của một bàn tay, dính ngón 2 và ngón 3 của một bàn chân.
- Người em trai của đương sự (em út trong gia đình) lấy vợ không bị tật dính ngón; họ có một người con trai bình thường, không bị tật dính ngón.
- Bố của đương sự a sinh ra trong gia đình có 2 anh em trai. Bố đương sự a bị dính ngón 3 và ngón 4 của một bàn tay và ngón 2 và ngón 3 của một bàn chân. Người em trai của bố (chú của đương sự) bình thường, không bị tật dính ngón; vợ của anh ta cũng không bị tật dính ngón và họ có 4 người con: 2 con trai đầu và hai con gái kế tiếp đều không bị tật dính ngón. Mẹ của đương sự bình thường, không bị tật dính ngón.
- Ông nội của đương sự a bị tật dính ngón 3 và ngón 4 của một bàn tay, ngón 2 và ngón 3 của một bàn chân. Bà nội của đương sự bình thường, không bị tật dính ngón.

5.1.2. Gia hệ 2

Xây dựng gia hệ của đương sự b bị tình hoàn nữ tính hoá.

- Đương sự là một trẻ nhỏ có giới tính được chứng thực lúc khai sinh là giới nữ. Xét nghiệm nhiễm sắc thể có công thức karyotyp 46,XY. Hai tinh hoàn nằm trong ổ bụng nhưng hiệu quả nam hóa của nhiễm sắc thể Y và hormon nam giới không có, vì vậy bộ phận sinh dục ngoài tương tự như ở nữ giới.

- Khai thác tiền sử gia đình thấy bố mẹ của đương sự b có kiểu hình bình thường. Mẹ của đương sự b có một đời chồng trước và có với người chồng trước ba người con. Người con gái thứ nhất và người con gái út đều khỏe mạnh, họ đều đã lấy chồng và chồng của họ đều là người khỏe mạnh. Người con gái thứ nhất đã có hai con: một trai, một gái đều khỏe mạnh; người con gái út có hai con trai đều khỏe mạnh. Người con thứ hai bị tinh hoàn nữ tính hoá.
- Về họ ngoại được biết ông bà ngoại của đương sự b có 4 người con: người con gái thứ nhất khỏe mạnh, người con thứ hai bị "tinh hoàn nữ tính hoá", mẹ của đương sự b là con thứ ba. Người em gái của mẹ đương sự b khỏe mạnh.
- Chồng và hai con trai của chị gái người mẹ đương sự b khỏe mạnh. Chồng và hai con (con gái đầu lòng, con trai thứ hai) của em út người mẹ đương sự b cũng khỏe mạnh, không có gì phát triển lệch lạc về giới tính.
- Ông ngoại của đương sự b không bị phát triển lệch lạc về giới tính và đã chết từ lâu. Bà ngoại của đương sự b có kiểu hình bình thường và đã chết. Bố mẹ của bà ngoại (cụ ngoại) đương sự b không bị phát triển lệch lạc về giới tính và đã chết từ lâu.

5.1.3. Gia hệ 3

- Xây dựng gia hệ của đương sự c là nam giới 30 tuổi bị dị dạng ở da. Từ nhỏ, sau khi để ít lâu, da của đương sự c trở nên sẫm màu và phủ những vảy thô có những phần nhú khỏi mặt da hình trụ dài khoảng 2,5 cm phủ ở khắp người trừ ở bàn tay, gót chân, đầu và mặt.
- Vợ của đương sự c là người khỏe mạnh, không có bệnh di truyền gì. Họ có một con trai 5 tuổi cũng bị dị hình ở da như bố (đương sự c) và người vợ đang có thai.
- Gia đình đương sự c có 9 anh chị em mà đương sự c là con thứ tư trong gia đình. Ba người chị gái và bốn cô em gái kế sát đương sự c đều có kiểu hình bình thường. Em trai út của đương sự c cũng bị dị hình ở da như đương sự c.
- Mẹ đương sự c có kiểu hình bình thường, còn bố đương sự c và 5 người em trai của bố (các chú của đương sự c) cũng đều bị dị hình ở da như đương sự c. Những người chú này không lập gia đình và không có con.
- Ông nội của đương sự c cũng bị dị hình da, còn bà nội có kiểu hình bình thường.
- Ông bà ngoại của đương sự c là những người khỏe mạnh, không có bệnh di truyền.

5.2. Phân tích 7 gia hệ bệnh di truyền đã được lập sẵn. Lý luận để đưa ra kết luận về quy luật di truyền của bệnh trong gia hệ

5.2.1. Các căn cứ để phân tích gia hệ

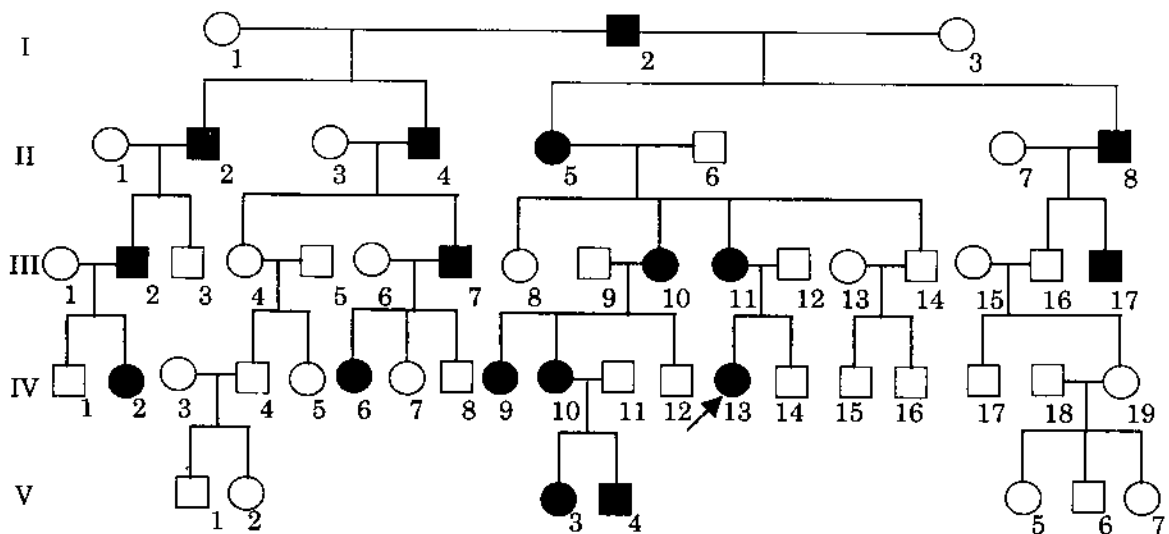
- Tính chất biểu hiện của bệnh qua các thế hệ (liên tục hay ngắt quãng).

- Tỷ lệ mắc bệnh của các thành viên trong từng gia đình, từng thế hệ và cả gia hệ.
- Tỷ lệ giới tính của những người bị bệnh trong gia hệ. Vai trò của bố mẹ trong việc truyền bệnh và gen bệnh cho con cái.
- Kết luận về quy luật di truyền của bệnh tật hay tính trạng trong gia hệ.
- Kiểu gen của đương sự và nguy cơ di truyền bệnh cho con cái sẽ có của đương sự.
- Viết ký hiệu của những người bắt buộc mang gen lặn trong gia hệ (nếu có).
- Viết ký hiệu số của đương sự. Ký hiệu số của đương sự được viết như sau: số thứ tự của thế hệ viết bằng chữ số La Mã và viết trước, số thứ tự của đương sự trong thế hệ được viết sau và viết bằng chữ Ả Rập, hai số được ngăn cách bằng dấu chấm.

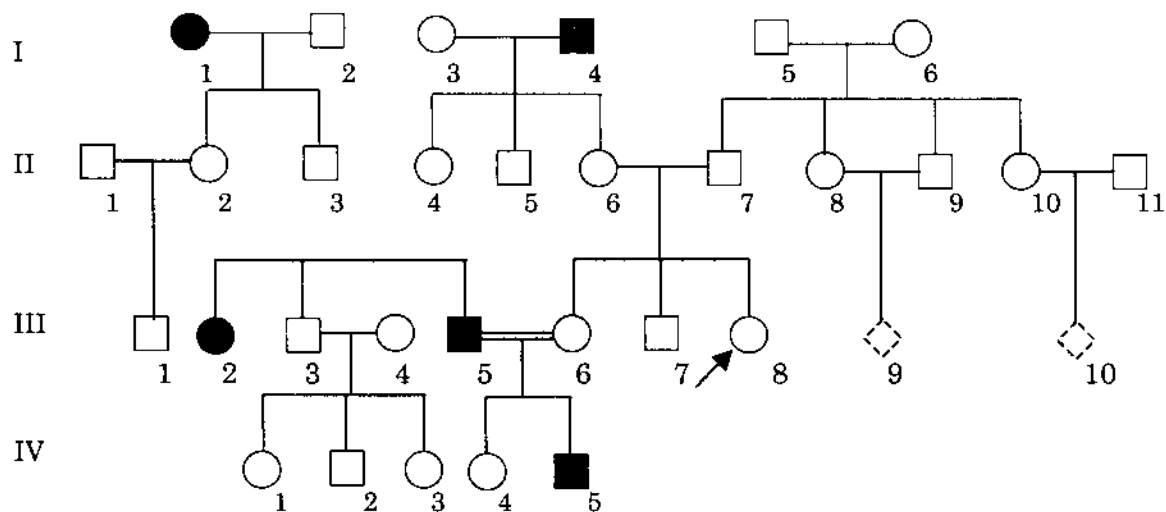
Ví dụ: đương sự thuộc thế hệ thứ tư và số thứ tự trong thế hệ là thứ bảy, ta sẽ có ký hiệu số của đương sự là IV.7.

5.2.2. Phân tích 7 gia hệ bệnh di truyền

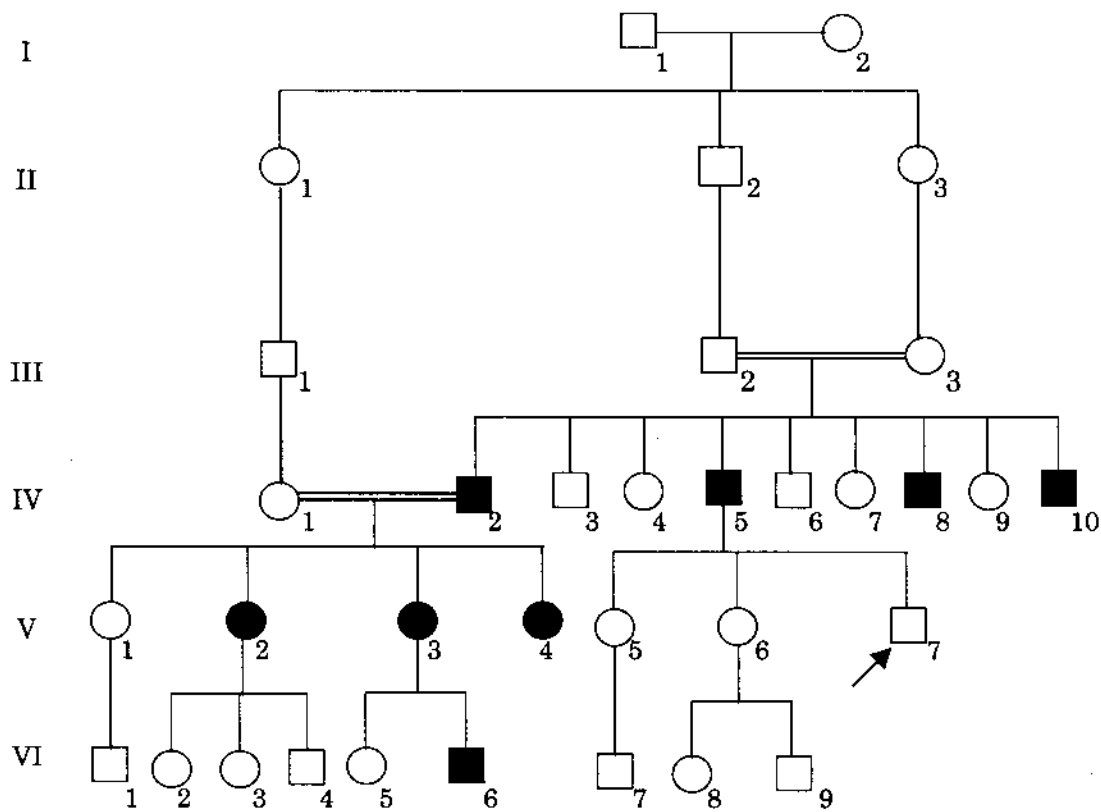
5.2.2.1. Gia hệ 1



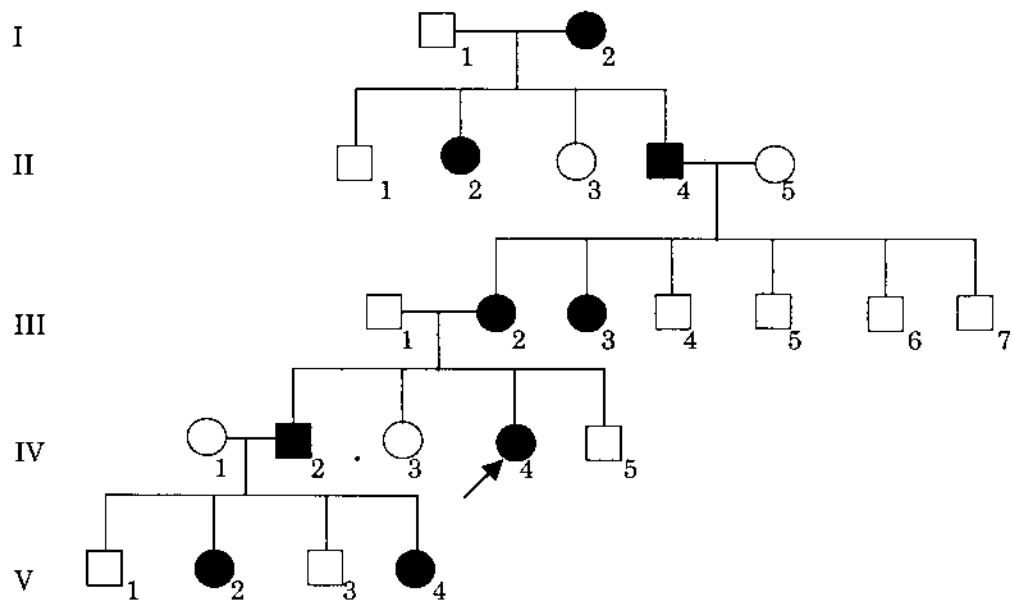
5.2.2.2. Gia hệ 2



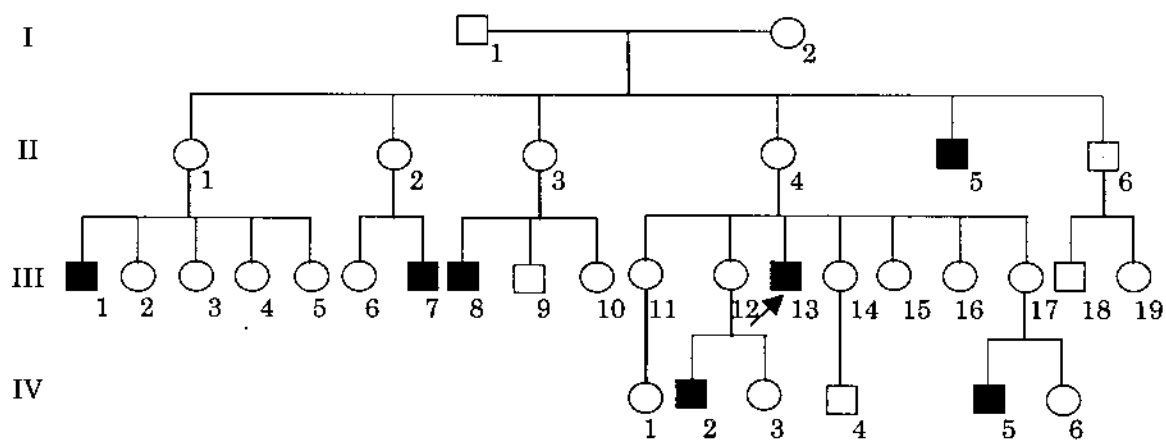
5.2.2.3. Gia hệ 3



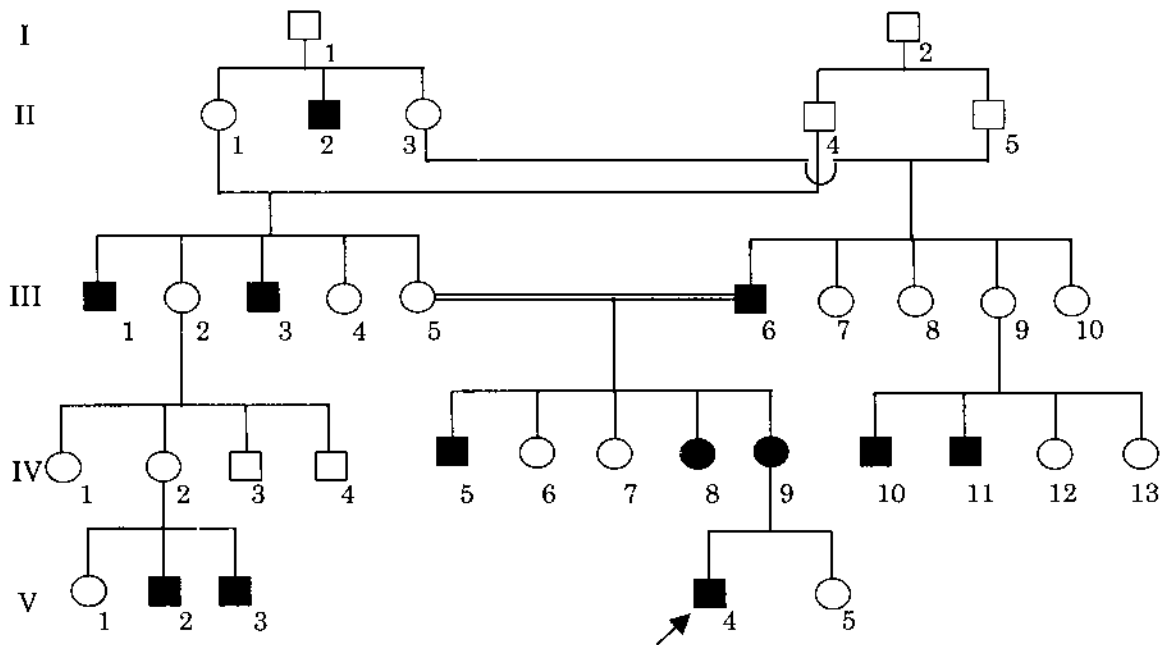
5.2.2.4. Gia hệ 4



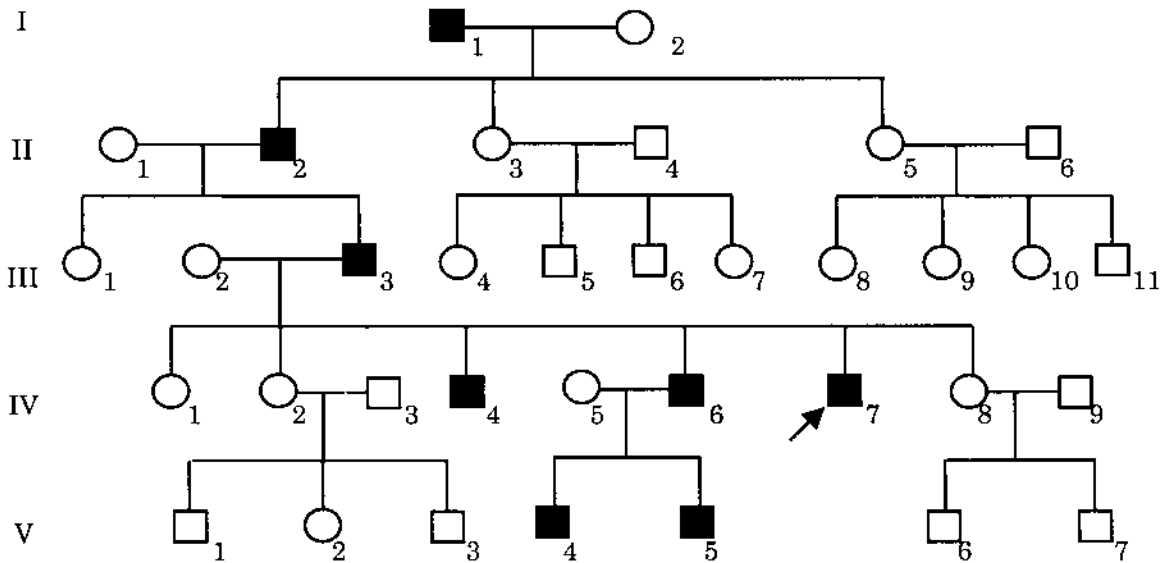
5.2.2.5. Gia hệ 5



5.2.2.6. Gia hệ 6



5.2.2.7. Gia hệ 7



6. ĐÁNH GIÁ KẾT QUẢ THỰC HÀNH

6.1. Đánh giá kết quả xây dựng 3 gia hệ đã cho (mỗi học sinh một gia hệ)

- Kết luận về quy luật di truyền của bệnh trong gia hệ, các căn cứ để rút ra kết luận đó.
- Nguy cơ di truyền bệnh cho thế hệ tiếp theo của đương sự.

6.2. Đánh giá kết quả phân tích 7 gia hệ bệnh di truyền đã cho

- Phân tích các đặc điểm biểu hiện của bệnh qua các thế hệ.
- Kết luận về quy luật di truyền của bệnh trong gia hệ.
- Viết ký hiệu số của đương sự.
- Nguy cơ di truyền bệnh cho thế hệ tiếp theo của đương sự.

Bài 9

HÌNH ẢNH MỘT SỐ BẤT THƯỜNG BẨM SINH, HỘI CHỨNG VÀ BỆNH DI TRUYỀN

1. MỤC TIÊU

- Nhận biết được hình ảnh một số bất thường bẩm sinh.
- Nhận biết được hình ảnh một số hội chứng, bệnh di truyền thường gặp.

2. PHƯƠNG PHÁP HỌC

- Học trước phần lý thuyết về bất thường bẩm sinh, biểu hiện của các bệnh di truyền nhiễm sắc thể, di truyền đơn gen, đa nhân tố và bệnh rối loạn chuyển hoá.
- Đọc trước bài thực tập.

3. PHƯƠNG TIỆN DỤNG CỤ

Cho cả tổ sinh viên:

- Bảng hình.
- Video có sử dụng bảng hình.

4. CÂU HỎI LÝ THUYẾT

1. Trình bày phân loại bất thường bẩm sinh theo sự biểu hiện?
2. Trình bày những biểu hiện lâm sàng chính của hội chứng Down, Patau, Edwards, Turner, Klinefelter, bệnh loạn dưỡng cơ Duchenne, bạch tạng, tạo xương bất toàn, loạn sản sụn.

5. NỘI DUNG

Quan sát và phân tích các biểu hiện đặc trưng của:

- Các hội chứng di truyền.
- Các bệnh di truyền.
- Các dị tật.

6. ĐÁNH GIÁ KẾT QUẢ THỰC HÀNH

1. Mô tả các triệu chứng ngoại hình của người bị các tật: bàn chân vẹo (các tật của chi, đầu mặt, xương, tật lỗ đái lệch thấp, tinh hoàn chưa xuống bìu).
2. Mô tả các triệu chứng ngoại hình của người bị mắc hội chứng, bệnh: Bạch tạng, Down, Patau, Edwards, Turner, Klinefelter, loạn dưỡng cơ Duchenne, tạo xương bất toàn, loạn sản sụn.

NHÀ XUẤT BẢN Y HỌC

THỰC TẬP DI TRUYỀN Y HỌC

Chịu trách nhiệm xuất bản

HOÀNG TRỌNG QUANG

<i>Biên tập:</i>	BS. HẢI YẾN
<i>Sửa bản in:</i>	HẢI YẾN
<i>Trình bày bìa:</i>	CHU HÙNG
<i>Kt vi tính:</i>	BÙI THỊ THƯƠNG

Tìm đọc

- ❖ *Thực tập sinh học*
- ❖ *Vi sinh y học*
- ❖ *Cơ sở công nghệ sinh học*
- ❖ *Dị dạng bẩm sinh*
- ❖ *Thực tập hoá sinh*
- ❖ *Bệnh mắt bẩm sinh và di truyền*
- ❖ *Hoá sinh*
- ❖ *Lý sinh y học*
- ❖ *Sinh lý học (Tập 1 + 2)*
- ❖ *Mô học*

NHÀ XUẤT BẢN Y HỌC

Địa chỉ: 352 Đội Cấn - Ba Đình - Hà Nội

Tel: 04.7625922 - 7625934 - 7.627819 - Fax: 04.7625923

E-mail: Xuatbanyhoc@fpt.vn

Website: www.cimsi.org.vn/nhaxuatbanyhoc

GIÁ: 14.000Đ

¥017221

