



THỰC HIỆN TIÊU BẢN HIỂN VI CỐ ĐỊNH MÔ MÁU CHUỘT ĐỒNG BẰNG PHƯƠNG PHÁP NHUỘM KÉP WRIGHT - GIEMSA

Nguyễn Thị Hà¹

¹ Khoa Sư phạm, Trường Đại học Cần Thơ

Thông tin chung:

Ngày nhận: 29/03/2013

Ngày chấp nhận: 30/10/2013

Title:

Field - mouse blood permanent slide staining with wright - giemsa stain

Từ khóa:

Tiêu bản cố định, chuột đồng, mô máu, thuốc nhuộm Wright - Giemsa

Keywords:

Fixed specimen, Field-mouse, blood cell, Wright - giemsa stain

ABSTRACT

Field-mouse blood permanent slide stained with Wright - Giemsa stains in PH 7,4 phosphate buffer gave the high contrast in colours between nucleus and cytoplasm, cytoplasm and granules. Erythrocytes and five major types of leukocytes: neutrophils, eosinophils, basophils, lymphocytes and monocytes are distinguishable under the light microscope.

TÓM TẮT

Tiêu bản cố định mô máu chuột đồng được thực hiện bằng thuốc nhuộm Wright - Giemsa pha trong dung dịch đệm photphat pH 7,4 có sự tương phản rõ nét giữa màu của nhân và màu của tế bào chất, giữa màu của nền tế bào chất và màu của hạt. Có thể phân biệt được hồng cầu và 5 loại bạch cầu: bạch cầu trung tính, bạch cầu ưa axit, Bạch cầu ưa bazơ, bạch cầu lympho và bạch cầu mono dưới kính hiển vi quang học.

1 MỞ ĐẦU

Thực hiện tiêu bản hiển vi cố định mô máu chuột đồng bằng phương pháp nhuộm kép Wright - Giemsa với mục đích tìm được giá trị pH thích hợp để thấy được sự tương phản rõ nét giữa nhân và tế bào chất khi quan sát các loại huyết cầu, từ đó có thể nhận dạng được các thành phần của máu bao gồm hồng cầu và phân biệt được năm loại bạch cầu: bạch cầu trung tính, bạch cầu ưa axit, Bạch cầu ưa bazơ, bạch cầu lympho và bạch cầu mono, cung cấp thêm cho phòng thí nghiệm một số tiêu bản máu rõ, đẹp phục vụ cho công tác giảng dạy và học tập.

2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

2.1 Nguyên vật liệu

- Chuột đồng
- Thuốc nhuộm Wright và Giemsa

2.2 Phương pháp

2.2.1 Làm tổn thương chuột

Làm cho chuột bị thương khoảng vài ngày để kích thích chuột sản sinh nhiều bạch cầu.

2.2.2 Lấy máu

- Lấy đuôi chuột ra ngoài lồng và vệ sinh sạch.
- Cắt chóp đuôi chuột, vuốt nhẹ từ gốc đuôi ra ngoài để máu chảy ra ngay trên lame.

Chú ý: Thực hiện nhanh thao tác dàn máu để máu không bị đông.

2.2.3 Dàn máu

- Đặt lame kéo ngay phía trước giọt máu khoảng 0,5 cm.
- Lùi lame kéo cho đến khi chạm vào giọt máu.
- Nếu lượng máu nhiều thì nhắc lame kéo lên để loại bỏ máu thừa, sau đó đặt lame phía

trước giọt máu khoảng 1 cm. Nếu lượng máu vừa đủ thì không phải thực hiện thao tác này.

- Đặt lame kéo tạo với lame kính một góc khoảng 45°.

- Đẩy lame kéo về phía trước bằng cách trượt lên lame kính nằm ngang (động tác cần nhanh, đều và nhẹ)

- Khi đẩy tới đầu kia của lame máu phải được dàn hết.

2.2.4 Cố định bằng methanol

- Sau khi dàn máu xong lame kính phải được lắc nhanh để vệt máu khô hoàn toàn (mất ánh nước).

- Khi vệt máu dàn đã vừa khô hoàn toàn, cố định thật nhanh bằng methanol bằng cách dùng ống nhỏ giọt nhỏ methanol lên lame (được đặt nghiêng).

2.2.5 Nhuộm mẫu bằng thuốc nhuộm Wright - Giemsa đã pha với dung dịch đệm

- Sau khi vệt máu đã khô hết methanol, để lame trên mặt phẳng nằm ngang và nhỏ thuốc nhuộm Wright-Giemsa đã pha với dung dịch đệm ở các giá trị pH: 6,8- 6,9- 7,0- 7,1- 7,2- 7,3- 7,4- 7,5- 7,6- 7,7- 7,8- 7,9- 8,0. Dàn đều để thuốc nhuộm Wright-Giemsa phủ hết bề mặt vệt máu.

- Để yên 45 phút.

2.2.6 Rửa mẫu dưới vòi nước máy

- Sau khi nhuộm được 45 phút, đem lame rửa dưới vòi nước máy cho sạch hết thuốc nhuộm còn thừa.

- Để lame khô tự nhiên.

2.2.7 Dán lame

Sau khi mẫu đã khô nước hoàn toàn ta chấm Baume Canada vào 4 góc của lamelle và đặt lamelle lên vệt máu dàn đã được nhuộm. Trước khi dán lamelle, lau sạch vệt máu còn thừa trên lame trong lúc dàn máu.

Bảng 1: Kết quả quan sát tế bào chất và nhân khi nhuộm huyết cầu với wright- giemsa có dung dịch đệm ở những giá trị pH khác nhau

pH	Tế bào chất	Nhân	Nhận xét
6,8	- Hồng cầu có màu hồng đậm		
	- Bạch cầu không hạt có nền tế bào hơi xanh		
	- Bạch cầu ưa bazơ và axit chưa quan sát rõ hạt		
	- Bạch cầu trung tính có nền tế bào chất màu hồng rất đậm nên không thấy được hạt	Nhân các bạch cầu có màu tím hồng	Khó phân biệt được các loại bạch cầu hạt

2.2.8 Phương pháp đánh giá chất lượng tiêu bản

Ở mỗi giá trị pH của dung dịch đệm, tiêu bản máu được quan sát dưới kính hiển vi (độ phóng đại 900 lần). Mô tả lại màu tương phản của nhân và tế bào chất của mỗi loại huyết cầu. Từ đó chọn pH dung dịch đệm phù hợp pha với thuốc nhuộm Wright-Giemsa để có thể thực hiện được tiêu bản mô máu chuốt với sự tương phản giữa nhân và tế bào chất tốt nhất.

Tiêu chuẩn đánh giá chất lượng tiêu bản:

- Mẫu phải trong, không có bụi.
- Các tế bào phải còn nguyên vẹn, tế bào không bị biến dạng hay bề màng tế bào.
- Các tế bào trong mẫu phải được dàn đều, các tế bào không chồng chất lên nhau.
- Mẫu phải ăn màu phẩm nhuộm, đạt được sự tương phản màu rõ nét giữa nhân và tế bào chất:

- + Hồng cầu có màu hồng.
- + Bạch cầu không hạt Bạch cầu mono: tế bào chất có màu xanh lơ, nhân màu tím đậm.
- + Bạch cầu lympho: tế bào chất có màu xanh lơ, nhân màu tím đậm.
- + Bạch cầu có hạt.

Bạch cầu ưa axit: tế bào chất có màu xanh lơ nhạt, hạt to đều màu đỏ đến đỏ cam, nhân màu tím đậm.

Bạch cầu ưa bazơ: hạt trong tế bào chất to không đều màu đen, nhân màu tím đậm.

Bạch cầu trung tính: nhân tím đậm, tế bào chất hồng nhạt, hạt màu tím đỏ.

3 KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Kết quả quan sát 30 tiêu bản ở mỗi giá trị pH khác nhau.

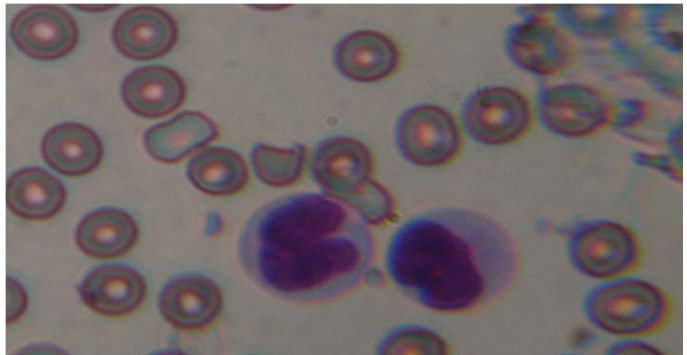
6,9	<ul style="list-style-type: none"> - Hồng cầu có màu hồng đậm - Bạch cầu không hạt như ở 6,8 - Bạch cầu ưa bazơ và axit chưa quan sát rõ hạt - Bạch cầu trung tính vẫn có nền tế bào chất màu hồng đậm 	<p>Nhân các bạch cầu có màu tím hồng</p>	<p>Như trên</p>
7,0	<ul style="list-style-type: none"> - Hồng cầu có màu hồng - Bạch cầu không hạt có nền tế bào chất xanh nhạt - Bạch cầu ưa bazơ và axit chưa thấy rõ hạt - Bạch cầu trung tính có nền tế bào chất màu hồng đậm nhưng nhạt hơn ở 6,9 	<p>Nhân các bạch cầu có màu tím hồng đậm</p>	<p>Như trên</p>
7,1	<ul style="list-style-type: none"> - Hồng cầu có màu nhạt hơn ở 7,0 - Bạch cầu không hạt như ở 7,0 - Bạch cầu ưa bazơ và axit đều chưa thấy rõ hạt - Bạch cầu trung tính như ở 7,0 	<p>Nhân các bạch cầu có màu tím hồng đậm</p>	<p>Như trên</p>
7,2	<ul style="list-style-type: none"> - Hồng cầu có màu hồng như ở 7,1 - Bạch cầu không hạt có nền tế bào chất xanh như ở 7,0 và 7,1. - Bạch cầu ưa bazơ chưa thấy hạt rõ - Bạch cầu ưa axit bắt đầu thấy được hạt, nền tế bào chất còn hơi hồng - Bạch cầu trung tính có nền tế bào chất hồng vẫn còn hơi đậm nên chưa thấy rõ màu của hạt. 	<p>Nhân các bạch cầu có màu tím hồng đậm hơn</p>	<p>Bắt đầu có thể phân biệt được các loại tế bào hạt</p>
7,3	<ul style="list-style-type: none"> - Hồng cầu có màu hồng nhạt - Bạch cầu không hạt có nền tế bào chất màu xanh lơ - Bạch cầu ưa bazơ có hạt rõ hơn ở 7,2 - Bạch cầu ưa axit như ở 7,2 - Bạch cầu trung tính như ở 7,2 	<p>Nhân các bạch cầu có màu như ở 7,2</p>	<p>Như trên</p>
7,4	<ul style="list-style-type: none"> - Hồng cầu có màu hồng nhạt - Bạch cầu không hạt có nền tế bào chất màu xanh lơ rõ hơn - Bạch cầu ưa bazơ rõ hạt hơn ở 7,3 - Bạch cầu ưa axit có nền tế bào chất hơi xanh, hạt màu hồng rõ nét hơn ở 7,3 - Bạch cầu trung tính, nền tế bào chất hồng có màu tím của hạt. 	<p>Nhân các bạch cầu có màu tím hồng đậm hoặc tím đậm</p>	<p>Có sự tương phản rõ nét, có thể nhận diện được dễ dàng các loại bạch cầu có hạt qua hạt trong tế bào chất và 2 loại bạch cầu không hạt</p>
7,5	<ul style="list-style-type: none"> - Hồng cầu có màu hồng nhạt ửng hơi xanh - Bạch cầu không hạt có nền tế bào chất xanh hơi hồng ở vùng gần nhân - Bạch cầu ưa bazơ như ở 7,4 - Bạch cầu ưa axit có nền tế bào chất xanh hơn nên không còn rõ màu hạt - Bạch cầu trung tính như ở 7,4 	<p>Nhân các bạch cầu có màu tím hồng đậm hoặc tím đậm</p>	<p>Sự tương phản giảm dần</p>
7,6	<ul style="list-style-type: none"> - Hồng cầu có màu hồng nhạt ửng xanh nhiều hơn - Bạch cầu không hạt có nền tế bào chất như ở 7,5 - Bạch cầu ưa bazơ không còn rõ hạt. - Bạch cầu ưa axit như ở 7,5 - Bạch cầu trung tính vẫn như ở 7,4 và 7,5. 	<p>Nhân các bạch cầu có màu tím hồng đậm hoặc tím đậm</p>	<p>Như trên</p>
7,7	<ul style="list-style-type: none"> - Hồng cầu có màu như ở 7,6 - Bạch cầu không hạt có nền tế bào chất xanh nhưng hồng nhiều hơn ở vùng gần nhân - Bạch cầu ưa bazơ không còn rõ hạt - Bạch cầu ưa axit có nền tế bào chất xanh hơn nên không còn rõ hạt - Bạch cầu trung tính có vùng tế bào chất màu hồng tím đậm 	<p>Nhân các bạch cầu có màu tím hồng đậm hoặc tím đậm</p>	<p>Như trên</p>

7,8	<ul style="list-style-type: none"> - Hồng cầu ửng xanh nhiều hơn hồng - Bạch cầu không hạt có nền tế bào chất như ở 7,7 - Bạch cầu ưa bazơ và axit không còn rõ hạt - Bạch cầu trung tính như ở 7,7 	Nhân các bạch cầu có màu tím hồng đậm hoặc tím đậm	Sự tương phản mất dần khó nhận diện được các loại bạch cầu
7,9	<ul style="list-style-type: none"> - Hồng cầu có màu như ở 7,8 - Bạch cầu không hạt như ở 7,7; 7,8 - Bạch cầu ưa bazơ và axit không còn rõ hạt - Bạch cầu trung tính có vùng tế bào chất gần như màu của nhân 	Nhân các bạch cầu có màu tím hồng đậm hoặc tím đậm	Như trên
8,0	<ul style="list-style-type: none"> - Hồng cầu có màu xanh nhiều hơn ở 7,8; 7,9 - Bạch cầu không hạt có nền tế bào chất hồng nhiều hơn xanh - Bạch cầu ưa bazơ và axit không còn quan sát được hạt nữa - Bạch cầu trung tính như ở 7,9 	Nhân các bạch cầu có màu tím hồng đậm hoặc tím đậm	Như trên

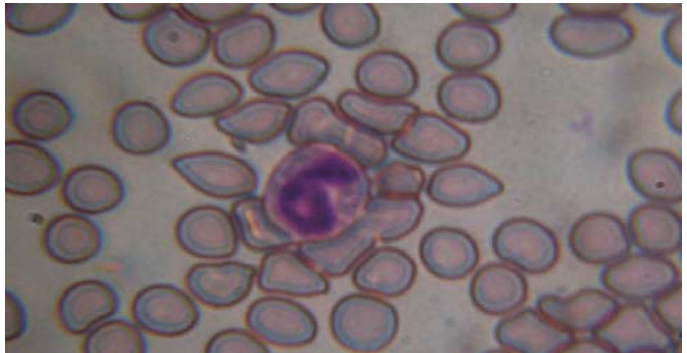
Qua kết quả ở bảng trên nhận thấy dung dịch đậm có pH = 7,4 có sự tương phản rõ nét giữa màu của nhân và màu của tế bào chất, giữa màu của nền tế bào chất và màu của hạt. Do đó dung dịch

đậm có pH = 7,4 được chọn để pha với thuốc nhuộm Wright- Giemsa trước khi nhuộm các huyết cầu ở máu chuột.

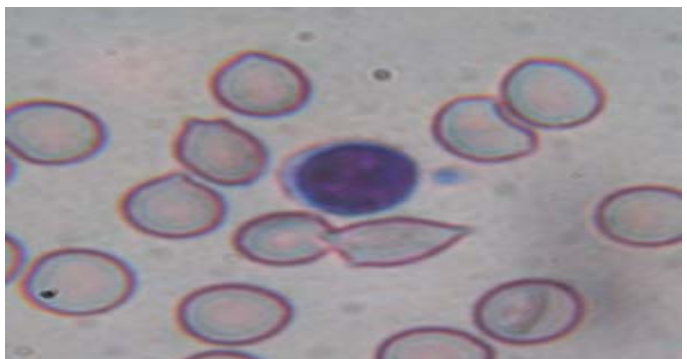
Hình 1: Bạch cầu mono (pH = 7,4; vật kính 60)



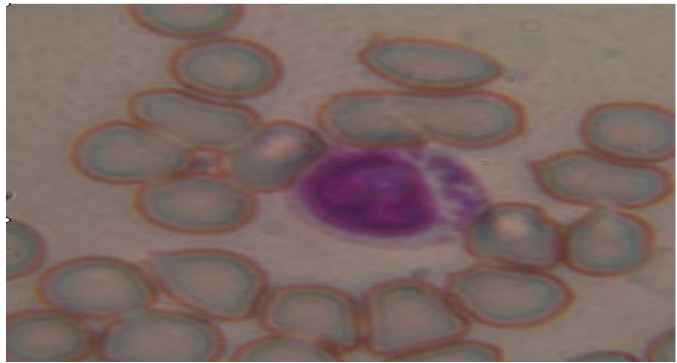
Hình 2: Bạch cầu ưa bazơ (pH 7,4, vật kính 60)



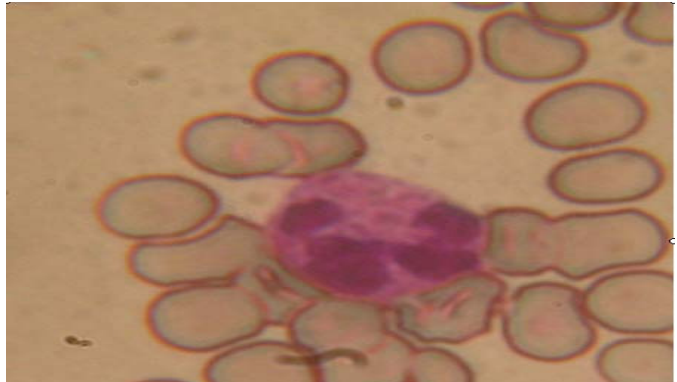
Hình 3: Bạch cầu lympho (pH 7,4; vật kính 60)



**Hình 4: Bạch cầu ưa axit
(pH 7,4; vật kính 60)**



**Hình 5: Bạch cầu trung tính
(pH 7,4; vật kính 60)**



4 KẾT LUẬN

Qua nghiên cứu các giá trị pH của dung dịch đệm khác nhau để pha thuốc nhuộm Wright – Giemsa, kết quả cho thấy ở giá trị pH = 7,4 các tế bào máu có màu tương phản rõ, nhân tế bào bạch cầu có màu tím đậm, tế bào chất và hạt đặc hiệu rõ nét về hình dạng và màu sắc, hình dạng từng tế bào và hình dạng nhân rất rõ, các tế bào còn nguyên vẹn, không bị bể màng hay biến dạng tế bào.

LỜI CẢM ƠN

Cám ơn Khoa Sư phạm Trường Đại học Cần Thơ đã tạo điều kiện vật chất cho thí nghiệm.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Trần Văn Bé. 1998. Lâm sàng huyết học. Nhà xuất bản Y học.

2. Lê Thị Ngọc Hân. 2000. Thực hiện tiêu bản máu cóc và máu chuột bằng phương pháp dàn máu. Luận văn tốt nghiệp. Trường Đại học Cần Thơ.

3. Trịnh Hữu Hằng, Đỗ Công Huỳnh. 2000. Sinh lý học người và động vật. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật.

4. Phạm Đình Lữ. 2008. Sinh lý học y khoa (Tập 1). Nhà xuất bản Y học.

5. Nguyễn Quang Mai. 2004. Sinh lý học người và động vật. Nhà xuất bản Khoa học và Kỹ thuật. Trường Đại học Y Hà Nội Bộ môn mô học và phôi thai học. 2002. Mô học. Nhà xuất bản Y học Hà Nội.

6. Gretchen L. Humason. 1962. Animal tissue techniques.