



# XỬ LÝ TÌNH HUỐNG KHI TÁCH CHIẾT ADN TRONG CHƯƠNG TRÌNH SINH HỌC CẤP TRUNG HỌC PHỔ THÔNG

Lê Minh Đức<sup>1</sup>, Phan Đức Duy<sup>2\*</sup>, Lữ Thị Thanh Nga<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Trường Đại học Sài Gòn, 273 An Dương Vương, tp. Hồ Chí Minh, Việt Nam

<sup>2</sup>Trường Đại học Sư phạm, Đại học Huế, 34 Lê Lợi, Huế, Việt Nam

<sup>3</sup>Trường THPT Tân Bình, 19 Hoa Bằng, TP Hồ Chí Minh

**Tóm tắt:** Trong quá trình tách chiết ADN ở tế bào động vật hay thực vật thuộc nội dung thực hành “Xác định thành phần hóa học trong tế bào” của chương trình Sinh học 10 đã xuất hiện nhiều tình huống gây khó khăn cho giáo viên và học sinh. Bài báo chỉ ra các tình huống thường gặp và cách xử lý, giúp quá trình thực hiện trở nên đơn giản, giảm thiểu thời gian, tăng độ tin cậy đối với kết quả thí nghiệm. Đồng thời, bài báo còn đề xuất quy trình tách chiết, nhận diện ADN đã được cải tiến nhằm giúp giáo viên và học sinh chủ động trong thực hiện và giảng dạy thí nghiệm trong điều kiện phòng thí nghiệm ở trường phổ thông hiện nay.

**Từ khóa:** Tách chiết ADN, thực hành sinh học 10, xử lý tình huống, cải tiến thí nghiệm

## 1. Mở đầu

Chương trình Sinh học 10 hiện hành cũng như chương trình giáo dục phổ thông mới (2018) đều có nội dung thực hành thí nghiệm nhận biết các thành phần hóa học của tế bào. Được thể hiện cụ thể trong nội dung “Thí nghiệm sử dụng enzym trong quả dưa tươi để tách chiết ADN” (Sinh học 10 hiện hành), thực hành xác định một số thành phần hoá học có trong tế bào: protein, lipid, acid nucleic (Chương trình giáo dục phổ thông mới).

Thực tế khi thực hiện nội dung này theo quy trình như trong sách giáo khoa (SGK), xuất hiện những khó khăn, bất cập, hạn chế trong điều kiện phòng thí nghiệm của các trường phổ thông như ở khâu chuẩn bị mẫu vật, pha chế sử dụng hóa chất, thao tác thực hiện. Mặt khác, kết quả thí nghiệm chưa chứng minh được phần kết tủa màu trắng đục là ADN. Chúng tôi gọi đó là những tình huống xảy ra trong quá trình thực hiện và giảng dạy thí nghiệm. Đối với các tình huống này, hầu hết giáo viên không tìm được biện pháp xử lý thích hợp. Vì vậy, giáo viên thường ít dạy nội dung thực hành này, làm giảm sự hứng khởi của học sinh khi học kiến thức tế bào học và di truyền học. Với những lý do trên, nghiên cứu này được thực hiện với mục tiêu

\*Liên hệ: duy1264@gmail.com

Nhận bài: 17-02-2020; Hoàn thành phản biện: 05-3-2020; Ngày nhận đăng: 06-3-2020

cung cấp cho giáo viên các tình huống xuất hiện trong quá trình tách chiết ADN ở tế bào động vật, thực vật và đề xuất các biện pháp xử lý một cách khoa học, hiệu quả. Trên cơ sở đó đề xuất quy trình tách chiết ADN cải tiến để giáo viên và học sinh thực hiện thí nghiệm đơn giản, nhanh, tiết kiệm chi phí và thời gian hơn, phù hợp với điều kiện dạy học ở trường phổ thông hiện nay [1, 2].

## 2. Phương pháp

– Tiến hành khảo sát, phỏng vấn giáo viên phổ thông và các chuyên gia để thu thập nguồn tình huống liên quan đến thí nghiệm. Đề xuất các phương án xử lý, lựa chọn và thực nghiệm các phương án đã chọn.

– Chọn quy trình tách chiết ADN như trong SGK sinh học 10 làm chuẩn. Tiến hành cải tiến các bước thực hiện, các công đoạn thí nghiệm. Mỗi bước đều bố trí nghiệm thức lặp lại 3 lần, tiến hành so sánh và đánh giá kết quả.

– Phát hiện và đề xuất các biện pháp xử lý tình huống và xây dựng quy trình cải tiến theo hướng: đơn giản, dễ thực hiện, an toàn, giảm chi phí, tiết kiệm thời gian, tỉ lệ thành công cao. Tiêu chí bao gồm: lượng phân tử ADN thu được nhiều và chứng minh phân tử tách chiết được là ADN thông qua phản ứng màu đặc trưng [3].

## 3. Kết quả và thảo luận

### 3.1. Mục tiêu thí nghiệm tách chiết ADN

- Học sinh tách chiết được ADN ra khỏi tế bào bằng các hóa chất và dụng cụ đơn giản.
- Giải thích được bản chất, ý nghĩa của các bước tiến hành thí nghiệm trong quy trình tách chiết ADN.
- Thực hiện được phản ứng màu đặc trưng để nhận biết ADN.
- Rèn luyện các thao tác thí nghiệm, phân tích kết quả và nhận diện ADN.

### 3.2. Thực trạng dạy học thí nghiệm tách chiết ADN của giáo viên phổ thông

Qua việc phỏng vấn và điều tra bằng phiếu đối với 90 giáo viên trung học phổ thông trên địa bàn Thành phố Hồ Chí Minh, Đồng Tháp và Đồng Nai, chúng tôi nhận thấy:

- 94,4% (85/90) giáo viên nhận thấy cần thiết cho học sinh thực hành tách chiết và quan sát ADN từ động vật và thực vật.
- 27,8% (25/90) giáo viên chưa tự tin trong việc hướng dẫn học sinh sử dụng các thiết bị và thực hiện các bước trong bài thực hành thí nghiệm này.

– 28,9% (26/90) giáo viên tự tin trong việc giải thích, chứng minh kết quả thí nghiệm này.

– Chỉ có 12,2% (11/90) giáo viên có dạy bài thực hành tách chiết ADN ở phòng thí nghiệm, trong đó 100% giáo viên chưa chứng minh được kết quả thu được trong thí nghiệm có phải là ADN hay không.

*Những khó khăn giáo viên gặp phải khi tiến hành thí nghiệm như sau:*

– Không đủ thời gian để thực hiện việc tách chiết ADN trong một tiết học.

– Khó thực hiện trong khâu xử lý và bảo quản mẫu gan gà hoặc gan heo trong các tiết học thực hành do phòng thí nghiệm không có tủ lạnh bảo quản khi dạy nhiều lớp trong một tuần.

– Kết quả ADN thu được trong gan gà và gan heo còn lẫn nhiều tạp chất.

– Giáo viên chưa chứng minh được kết quả thu được có phải là ADN hay không.

Những khó khăn trên đã ảnh hưởng không nhỏ đến kết quả dạy học thực hành thí nghiệm hiện nay. Thực tế trên đặt ra yêu cầu cần thiết phải nghiên cứu khắc phục các tình huống khi tiến hành giảng dạy thí nghiệm. Xây dựng quy trình tách chiết ADN cải tiến phù hợp với điều kiện nhà trường phổ thông hiện nay.

### **3.3. Hệ thống tình huống và biện pháp xử lý khi thực hành thí nghiệm tách chiết ADN**

Quy trình sử dụng enzyme trong quá trình tách chiết ADN (SGK sinh học 10) gồm các bước sau: nghiền mẫu vật, tách ADN ra khỏi tế bào và nhân tế bào, kết tủa ADN trong dịch tế bào bằng cồn và tách ADN ra khỏi lớp cồn [2].

Quy trình này không có công đoạn nhận dạng ADN sau khi tách khỏi tế bào, gây khó khăn cho giáo viên trong việc phân tích, chứng minh kết quả thí nghiệm.

#### *3.3.1. Tình huống trong sử dụng hóa chất, dụng cụ thí nghiệm*

– *Dụng cụ thí nghiệm.*

*Tình huống 1:* Sau khi thu được dịch chiết tế bào, quy trình SGK sử dụng ống nghiệm để thực hiện các bước tiếp theo. Thực tế cho thấy, ống nghiệm có thể tích, diện tích mặt thoáng nhỏ nên việc kết tủa ADN bằng cồn cần nhiều thời gian và lượng ADN thu được ít hơn. Thao tác khuấy, vớt ADN khó khăn hơn.

*Biện pháp xử lý:* Thay thế ống nghiệm bằng cốc thủy tinh 100 ml hoặc 250 ml. Kết quả thực nghiệm cho thấy, khi thao tác bằng cốc thủy tinh, lượng ADN thu được nhiều và nhanh hơn so với ống nghiệm. Do cốc thủy tinh có thể tích và diện tích bề mặt lớn, tạo thuận lợi cho việc kết tủa và nổi lên trên bề mặt của các phân tử ADN, lượng ADN thu được nhiều hơn so với trong ống nghiệm.

– Hóa chất thí nghiệm

*Tình huống 2:* Quy trình trong SGK đề xuất sử dụng nước chiết quả dứa chứa enzyme bromelain giúp biến tính và tách các protein histon khỏi phân tử ADN, tạo điều kiện cho việc thu nhận ADN tinh sạch. Trong thực tế hiện nay, một số giáo viên không có điều kiện chuẩn bị nước chiết quả dứa cho nhiều tiết dạy liên tục ở các lớp khác nhau.

*Biện pháp xử lý:* Giáo viên có thể bỏ qua công đoạn dùng nước chiết quả dứa nếu không chuẩn bị được. Kết quả thực nghiệm cho thấy, các phân tử ADN tuy còn lẫn nhiều protein, nhưng chúng vẫn cho phản ứng màu xanh lam với thuốc thử diphenylamine ở nhiệt độ cao. Đây là phản ứng đặc trưng để nhận diện sự có mặt của phân tử ADN. Hơn nữa, trong một bài thực hành ở phổ thông, nhằm nhận biết và phát hiện nhanh ADN có trong tế bào mà không nhất thiết phải có ADN đủ sạch, thì việc giảm bớt một số công đoạn trong quy trình nhằm giảm bớt thời gian và kinh phí thực hiện là điều cần thiết.

Nước rửa chén có chứa chất tẩy sodium dodecyl sulfate phá hủy lớp lipid kép của màng tế bào, màng nhân đồng thời cũng phân hủy các protein gắn kết với ADN [5].

### 3.3.2. Tình huống trong khâu lựa chọn mẫu

*Tình huống 3:* Theo SGK Sinh học 10, gan gà, gan heo và đậu Hà Lan được đề xuất làm mẫu vật để tách chiết ADN. Những mẫu vật này khó bảo quản, thao tác nghiền mẫu tốn nhiều thời gian.

*Biện pháp xử lý:* Thay thế các mẫu trên bằng mẫu hành tây, chuối chín hoặc tế bào niêm mạc miệng. Hành tây và chuối là hai loại mẫu vật dễ tìm kiếm, bảo quản lâu, giá thành thấp, thao tác nghiền mẫu đơn giản. Tế bào niêm mạc miệng được lấy từ chính các em học sinh sẽ tạo cho các em sự tự tin, thích thú khi nhìn thấy ADN của chính mình sau quá trình thí nghiệm.

### 3.3.3. Tình huống trong thao tác xử lý mẫu vật

*Tình huống 4:* Nếu mẫu vật là chuối chín hoặc hành tây thì các quy trình phổ biến hiện nay thường hướng dẫn lọc lấy dịch chiết tế bào sau khi nghiền mẫu với nước. Công đoạn này giúp thu được lượng ADN tinh sạch nhiều nhưng tốn nhiều thời gian và dụng cụ hơn khi làm thí nghiệm.

*Biện pháp xử lý:* Có thể bỏ qua công đoạn lọc mẫu bằng vải lọc để tiết kiệm thời gian và dụng cụ thí nghiệm mà vẫn thu được lượng ADN cần thiết trong thí nghiệm. Trong quá trình nghiền mẫu, cần bổ sung khoảng 5 g NaCl tinh thể (trong 100 g mẫu) tạo thuận lợi cho việc tách và kết tủa phân tử ADN. Để tiết kiệm thời gian và dụng cụ, đối với mẫu chuối chín nên sử dụng túi nilon vuốt mép để nghiền mẫu nhanh. Đối với hành tây, sử dụng cối chày để nghiền nếu không có máy xay. Thực nghiệm cho thấy thời gian nghiền mẫu bằng chày cối sứ đối với hành tây và chuối chín trong 3 phút cho kết quả tối ưu.

Thời gian nghiền mẫu ảnh hưởng đến lượng ADN thu được. Thời gian nghiền mẫu hợp lý (khoảng 3 phút), bảo vệ ADN khỏi những tác nhân cơ học (nghiền, lắc mạnh) và tác nhân hóa học (enzyme nuclease nội bào). Trong nhiều trường hợp, giáo viên và học sinh nghiền mẫu quá nhanh, mẫu mô chưa được nghiền hoàn toàn hoặc quá lâu khiến ADN bị phân giải bởi chính các enzyme nội bào.

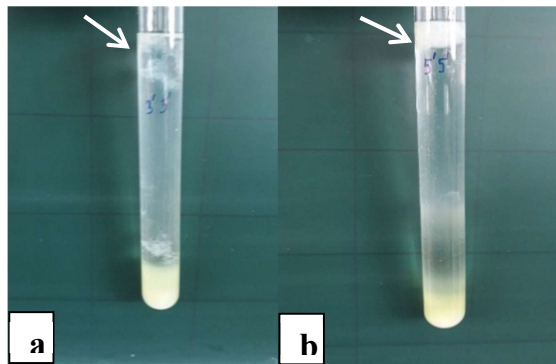
*Tình huống 5:* Đối với tế bào niêm mạc miệng, các quy trình hiện nay thường sử dụng que lấy phết mẫu niêm mạc miệng chuyên dụng có giá thành cao, một số trường không trang bị được.

*Biện pháp xử lý:* Sử dụng 20 ml nước muối sinh lý 0,9% để súc miệng trong 1 phút, nhả vào cốc thủy tinh 250 ml; mẫu thu được chứa nhiều tế bào niêm mạc miệng. Trước khi lấy mẫu, học sinh cần súc miệng bằng nước sạch để tránh nhiễm tạp chất trong mẫu. Các bước tiếp theo sẽ thực hiện giống như quy trình tách ADN từ chuối và hành tây.

Lớp niêm mạc miệng ở người có đặc điểm rất dễ bong tróc ngay cả trong điều kiện bình thường khi nhai, nuốt thức ăn. Súc miệng bằng nước muối sẽ giúp thu được lượng tế bào cần thiết cho thí nghiệm. Do ADN là phân tử phân cực có gốc phosphate mang điện tích âm, có khả năng liên với các cation ( $\text{Na}^+$ ) của dung dịch muối, trung hòa điện tích của phân tử ADN, làm cho các phân tử ADN có thể kết dính với nhau thay vì đẩy nhau, khi gặp cồn chúng dễ dàng bị kết tủa và được đẩy lên trên dưới tác dụng của các lực vật lý [4].

#### 3.3.4. Tình huống trong khâu tách ADN ra khỏi tế bào

*Tình huống 6:* Ở bước sử dụng nước rửa chén để phá màng tế bào, màng nhân, học sinh thường sử dụng quá nhiều nước rửa chén và tạo ra nhiều bọt, ảnh hưởng đến việc kết tủa ADN ở bước sau; ngược lại nếu cho quá ít lượng nước rửa chén thì sẽ không thu đủ lượng ADN cần thiết.



**Hình 1.** Lượng ADN thu được ở chuối: a) Không bổ sung NaCl; b) bổ sung dung dịch NaCl 2%

*Biện pháp xử lý:* Nghiên cứu cho thấy, cần dùng lượng nước rửa chén vừa đủ với tỉ lệ 1/4 (5 ml nước rửa chén cho 20 ml dịch chiết tế bào), khuấy nhẹ tránh việc tạo bọt, để yên trong 1–2 phút nhằm ly giải màng tế bào và màng nhân, giải phóng ADN.

Nước rửa chén thông dụng chứa sodium dodecyl sulfate, là chất tẩy hoạt động bề mặt lưỡng tính, vì mang điện tích nên chất tẩy ion hóa có thể phá vỡ liên kết ion và liên kết hydro, có tác dụng biến tính hoàn toàn protein do chất này liên kết với tất cả các nhóm R của protein, phá hủy màng lipid kép của tế bào và nhân bằng cách xen vào giữa hai lớp phospholipid kép. Tạo điều kiện cho việc kết tủa và cô lập ADN ở các bước kế tiếp [4, 5, 6].

### 3.3.5. Tình huống trong công đoạn kết tủa ADN bằng cồn

*Tình huống 7:* Các quy trình phổ biến hiện nay thường sử dụng cồn ethanol 70–90% hoặc dùng cồn ethanol 70% lạnh giúp ADN kết tủa nhanh và hiệu quả hơn. Nếu không chuẩn bị được cồn ethanol lạnh 70–90% thì phải làm thế nào?

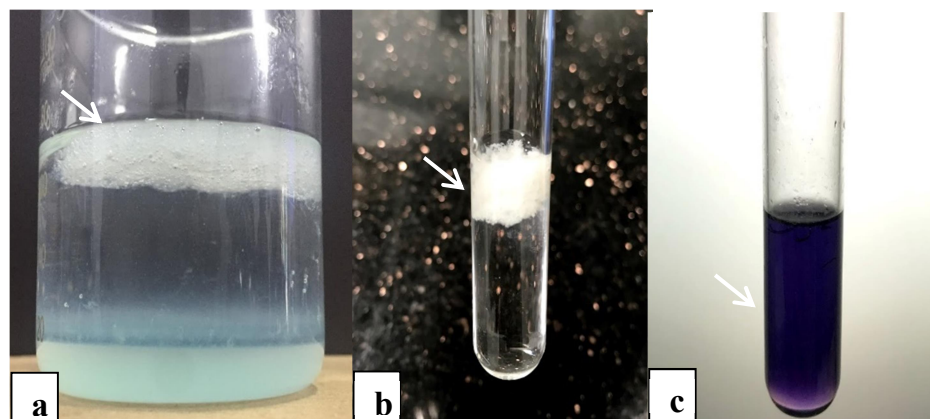
*Biện pháp xử lý:* Trong điều kiện phòng thí nghiệm nếu không có cồn ethanol thì việc sử dụng cồn methanol 70–96% ở nhiệt độ phòng vẫn không ảnh hưởng nhiều đến kết quả thí nghiệm. Sau công đoạn phá màng tế bào bằng nước rửa chén, rót từ từ cồn methanol 70–96% với thể tích gấp đôi thể tích mẫu dịch nghiền, sau khoảng 1 phút sẽ thấy xuất hiện các phân tử kết tủa màu trắng đục do ADN tan trong nước nhưng không tan trong cồn, dưới tác động của lực vật lý sẽ nổi lên trên bề mặt.

### 3.3.6. Tình huống trong việc nhận dạng ADN

*Tình huống 8:* Quy trình tách chiết ADN trong SGK hiện nay không có công đoạn nhận biết kết tủa màu trắng thu được có phải là ADN hay không. Vậy làm sao để khẳng định chúng là ADN chứ không phải vật chất khác trong tế bào? Điều này khiến cho việc phân tích và chứng minh kết quả thí nghiệm gặp nhiều khó khăn đối với giáo viên và học sinh.

*Biện pháp xử lý:* Sử dụng phản ứng màu đặc trưng của ADN với diphenylamine để nhận biết ADN. Thuốc thử diphenylamine 0,5% được pha trong dung dịch axit sulfuric đậm đặc. Dùng kim mũi mác hoặc que tre nhẹ nhàng vớt một phần kết tủa màu trắng cho vào ống nghiệm chứa 10 ml diphenylamine, đun cách thủy 10 phút sẽ thấy xuất hiện màu xanh lam, chứng minh mẫu kết tủa thu được là ADN.

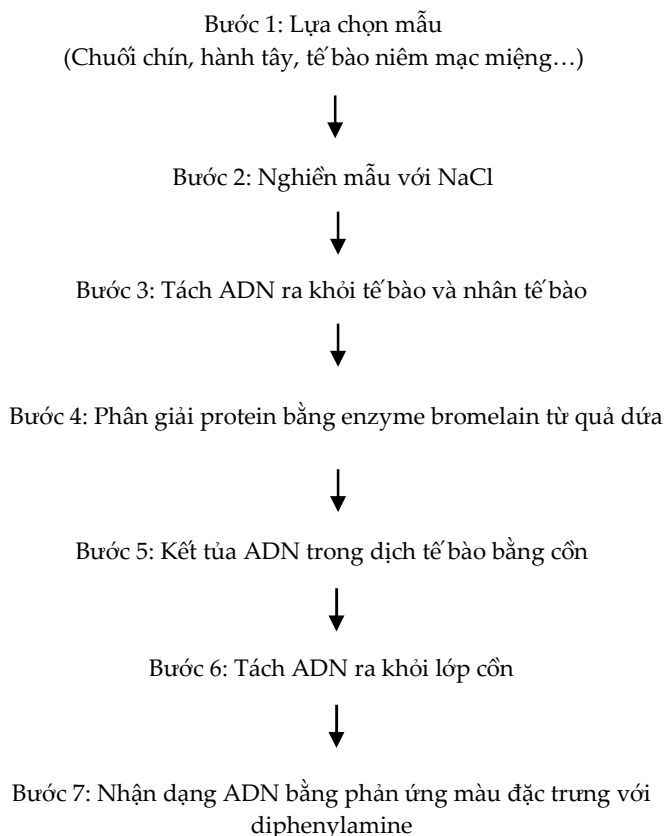
ADN phản ứng với diphenylamine dựa vào sự chuyển đổi của đường deoxyribose có trong phân tử ADN (không có trong ARN). Khi bị thủy phân ở nhiệt độ cao trong môi trường acid, deoxyribose chuyển thành hydroxylevulinyl aldehyde, phản ứng với diphenylamine tạo phức hợp màu xanh lam bền vững. Mức độ màu xanh lam tỉ lệ thuận với hàm lượng của ADN [5].



**Hình 2.** Phản ứng màu đặc trưng nhận diện ADN: a) ADN kết tủa trong cồn; b) ADN được làm sạch trong ống nghiệm; c) Phản ứng màu xanh lam đặc trưng của ADN với diphenylamine

### 3.4. Quy trình tách chiết ADN cải tiến

Thông qua kết quả thực nghiệm, chúng tôi đề xuất quy trình tách chiết ADN cải tiến (Hình 3) với các bước đơn giản, mẫu vật dễ tìm, dễ thực hiện và tiết kiệm thời gian. Nội dung cải tiến so với quy trình trong SGK như sau: Đề xuất sử dụng mẫu vật dễ chuẩn bị, chi phí thấp như chuối, hành tây, tế bào niêm mạc miệng; công đoạn phân giải protein bằng dịch chiết quả dứa có thể bỏ qua nếu giáo viên không chuẩn bị được; sử dụng cốc thủy tinh thay thế ống nghiệm giúp các thao tác nhanh, dễ thực hiện, thu được nhiều ADN; đề xuất nghiền mẫu với tinh thể NaCl nhằm tăng hiệu quả của thí nghiệm; bổ sung công đoạn chứng minh phần kết tủa là ADN bằng phản ứng màu đặc trưng với diphenylamine; thời gian thực hiện bài thực hành thí nghiệm theo quy trình cải tiến chỉ mất 15 phút, giảm một nửa thời gian so với quy trình trong SGK [2, 4, 5].



Hình 3. Quy trình tách chiết ADN cải tiến

#### 4. Kết luận

Trên cơ sở thực hiện thí nghiệm tách chiết ADN, chúng tôi đã phát hiện được các tình huống có thể diễn ra và đề xuất các biện pháp xử lý nhằm nâng cao hiệu quả của thí nghiệm. Các tình huống đã nghiên cứu được sẽ là nguồn tài liệu bổ ích giúp giáo viên trong giảng dạy; đồng thời cung cấp các tình huống thực tiễn cho giảng viên các trường sư phạm trong việc rèn luyện kỹ năng dạy học thực hành thí nghiệm cho sinh viên sư phạm, nâng cao chất lượng đào tạo giáo viên sinh học. Thông qua các biện pháp xử lý tình huống, chúng tôi đã xây dựng quy trình tách chiết ADN cải tiến nhằm thực hiện thí nghiệm đơn giản, tiết kiệm thời gian và chi phí, góp phần tạo động lực cho việc triển khai hiệu quả các hoạt động thực hành thí nghiệm ở trường phổ thông hiện nay.



## TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Bộ Giáo Dục và Đào Tạo (2018), *Chương trình giáo dục phổ thông môn Sinh học*, Hà Nội.
2. Nguyễn Thành Đạt, Phạm Văn Lập, Trần Dụ Chi, Trịnh Nguyên Giao, Phạm Văn Ty (2012), *Sinh học 10*, Nxb. Giáo dục Việt Nam, Hà Nội.
3. Lê Minh Đức, Phan Đức Duy (2018), Xử lý tình huống khi thực hiện tiêu bản hiển vi tạm thời quan sát đột biến số lượng nhiễm sắc thể ở thực vật, *Tạp chí giáo dục*, 424, 51–54.
4. Mai Sĩ Tuấn và cộng sự (2013), *Thực hành sinh học trong trường phổ thông*, Nxb. Giáo dục Việt Nam, Hà Nội.
5. Nguyễn Xuân Việt (2016), *Giáo trình Thực hành sinh học tế bào*, Nxb. Đại học Sư phạm, Hà Nội.
6. Harvey Lodish, Arnold Berk, Chris A. Kaiser, Monty Krieger, et al (2019), *Molecular cell biology – Sinh học phân tử của tế bào – tập 3*, Nxb. Trè, Hà Nội.

## PROBLEM-SOLVING IN DNA EXTRACTION EXPERIMENT IN HIGH-SCHOOL BIOLOGY SYLLABUS

Le Minh Duc<sup>1</sup>, Phan Duc Duy<sup>2</sup>, Lu Thi Thanh Nga<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Sai Gon University, 273 An Duong Vuong, Ho Chi Minh city, Vietnam

<sup>2</sup>University of Education, Hue University

<sup>3</sup>Tan Binh High School, 19 Hoa Bang Str., Ho Chi Minh city, Vietnam

**Abstract:** In extracting DNA from animal or plant cells in the practice section "Determining the chemical composition of cells" in the grade 10 biology syllabus, there have been many situations that make it difficult for teachers and students. This study points out common situations and suggests solutions that make the process simple, reducing operational time and increasing the reliability of the experimental results. It is thereby helping teachers and students be active in performing and teaching the experiment. The study also proposes an improved process of DNA extraction and identification for teachers and students to perform easily under the current laboratory conditions in high schools.

**Keywords:** DNA extraction, grade 10 biology experiments, problem-solving, improved experiment