

# Phát triển hệ kính hiển vi huỳnh quang siêu phân giải ứng dụng trong nghiên cứu vi-rút

Nguyễn Trọng Nghĩa<sup>1</sup>, Nguyễn Thị Bích Ngọc<sup>1</sup>, Trần Hồng Nhung<sup>1</sup>, Nguyễn Đức Toàn<sup>1</sup>, Nghiêm Thị Hà Liên<sup>1\*</sup>, Nguyễn Thị Thu Thủy<sup>2</sup>, Nguyễn Thanh Thủy<sup>2</sup>, Lê Trà My<sup>3</sup>, Đào Huyền Quyên<sup>4</sup>, Nguyễn Minh Hiền<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Viện Vật lý, Viện Hàn lâm KH&CN Việt Nam

<sup>2</sup>Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương

<sup>3</sup>Đại học Quốc gia Hà Nội

<sup>4</sup>Bệnh viện Bạch Mai

<sup>5</sup>Bệnh viện Thanh Nhàn

Ngày nhận bài 15/3/2021; ngày chuyển phản biện 23/3/2021; ngày nhận phản biện 26/5/2021; ngày chấp nhận đăng 2/6/2021

## Tóm tắt:

Kính hiển vi (KHV) huỳnh quang siêu phân giải là hệ kính ưu việt nhờ kết hợp tính năng chụp ảnh huỳnh quang với khả năng quan sát các mẫu sinh học vượt qua được giới hạn nhiễu xạ của KHV quang học. Hệ kính này giúp quan sát được mẫu sống với độ chính xác và độ phân giải cao. Vi-rút là đối tượng đặc trưng cho nghiên cứu sử dụng hệ kính này do hầu hết các loại vi-rút có kích thước nhỏ hơn giới hạn nhiễu xạ ( $<200$  nm). Trong nghiên cứu này, các tác giả đã xây dựng hệ thống KHV huỳnh quang siêu phân giải dựa trên kỹ thuật định vị đơn điểm, độ phân giải của kính đạt được là 20 nm. Đường kính mẫu vi-rút sốt xuất huyết (SXH) Dengue nuôi cấy trên tế bào BHK-21 được đánh dấu miễn dịch huỳnh quang có kết quả đo là  $84 \pm 12$  nm, trừ đi chiều dài của kháng thể, xấp xỉ với kết quả đo bởi KHV điện tử truyền qua (TEM, 45-60 nm). Sự thuận tiện của kỹ thuật chuẩn bị mẫu và chụp được hình ảnh vi-rút SXH Dengue nói riêng, các loại vi-rút nói chung bằng KHV huỳnh quang siêu phân giải với độ chính xác và độ phân giải cao sẽ đóng góp cho nghiên cứu, đào tạo và giảng dạy về vi-rút học.

**Từ khóa:** định vị đơn điểm, kính hiển vi huỳnh quang siêu phân giải, nanoscopy, STORM, vi-rút sốt xuất huyết Dengue.

## Chỉ số phân loại: 1.3

## Đặt vấn đề

KHV quang học luôn là công cụ đắc lực của khoa học sự sống nhờ ưu điểm nổi bật là khả năng quan sát các tế bào và mô sống. Nhiều nghiên cứu cải tiến KHV quang học thông qua các cải tiến về kỹ thuật chiếu quang, kỹ thuật xử lý ảnh... đã được thực hiện. Kết quả là sự ra đời của nhiều phương pháp hiển vi quang học phân giải cao, như KHV quang học quét trường gần (Scanning Nearfield Optical Microscope - SNOM) [1, 2], KHV huỳnh quang dập tắt cưỡng bức (Stimulated Emission Depletion - STED) [3, 4], và KHV huỳnh quang định vị đơn phân tử (Single Molecule Localization Microscopy - SMLM) [5]. KHV quang học SNOM có độ phân giải ngang tới vài chục nano mét, độ phân giải dọc vài nano mét, tùy thuộc vào khẩu độ của đầu dò. Hệ kính này có ưu điểm là độ phân giải không phụ thuộc vào bước sóng, cho phép quan sát bề mặt mẫu vật, tuy nhiên loại kính này không cho phép nghiên cứu sâu bên trong mẫu vật [6]. KHV STED được phát triển từ cấu hình KHV đồng tiêu cải tiến kỹ thuật chiếu sáng đồng thời hai chùm laser lên mẫu. Chùm thứ nhất có cường độ thấp kích thích các phân tử đánh dấu phát quang. Chùm thứ hai có bước sóng dài hơn, có cường độ mạnh hơn nhiều hội tụ hình vành khăn lên mẫu, có cường độ ở tâm bằng không. Chùm này cường

bức được các phân tử (được chùm thứ nhất kích thích) hồi phục về mức cơ bản. Do đó chỉ còn lại các phân tử ở tâm chùm phát huỳnh quang được ghi nhận. Kỹ thuật này không yêu cầu xử lý ảnh phức tạp và có thể đạt được độ phân giải ngang cỡ 30-70 nm, phân giải dọc trực cỡ 50-100 nm. Tuy nhiên, do kỹ thuật chiếu quang phức tạp, nên STED ít được lựa chọn phát triển tại nhiều phòng thí nghiệm [7]. Ảnh hiển vi huỳnh quang sử dụng kỹ thuật SMLM có độ phân giải ngang 20-50 nm [8]. Dựa trên phương pháp KHV huỳnh quang định vị đơn phân tử SMLM có hai kỹ thuật KHV siêu phân giải chính được phát triển đã đưa độ phân giải ngang xuống 20-50 nm, đó là KHV định vị quang hoạt (PALM - Photoactivatable Localization Microscopy) [9] và KHV quang dựng ảnh ngẫu nhiên (STORM - Stochastic Optical Reconstruction Microscopy) [10]. Kỹ thuật KHV huỳnh quang siêu phân giải tái tạo ảnh ngẫu nhiên STORM được phát triển từ năm 2006 [10]. Hai phương pháp STORM và PALM khác nhau về loại phân tử quang hoạt được sử dụng. Các chất phát quang sử dụng trong kỹ thuật PALM là các protein phát quang. Kỹ thuật STORM sử dụng quy trình đánh dấu miễn dịch huỳnh quang với các phân tử phát quang tổng hợp như cyanine, rhodamine... có độ bền quang cao hơn rất nhiều so với protein phát quang sử dụng trong kỹ thuật PALM. KHV siêu phân giải được sử dụng để đo kích

\*Tác giả liên hệ: Email: halien@iop.vast.vn

# Developing super-resolution fluorescent microscopy for virology research

Trong Nghia Nguyen<sup>1</sup>, Thi Bich Ngoc Nguyen<sup>1</sup>,  
Hong Nhung Tran<sup>1</sup>, Duc Toan Nguyen<sup>1</sup>,  
Thi Ha Lien Nghiem<sup>1\*</sup>, Thi Thu Thuy Nguyen<sup>2</sup>,  
Thanh Thuy Nguyen<sup>2</sup>, Tra My Le<sup>3</sup>, Huyen Quyen Dao<sup>4</sup>,  
Minh Hien Nguyen<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Institute of Physics, VAST

<sup>2</sup>National Institute of Hygiene and Epidemiology

<sup>3</sup>Vietnam National University, Hanoi

<sup>4</sup>Bachmai Hospital

<sup>5</sup>Thanhnhon Hospital

Received 15 March 2021; accepted 2 June 2021

## Abstract:

Taking advantage of the use of photoswitchable probes and high precision localisation of single molecules to surpass the diffraction limit, super-resolution fluorescence microscopy allows observing non-invasive live-cell at sub-diffraction size (<200 nm). Given the advantage of super-resolution fluorescence microscopy, our group has reconstructed the super-resolution fluorescence microscopy based on the single-molecule localisation microscopy technique with a resolution of 20 nm. In this research, the authors present the reconstruction process of the microscopy system and its application in observing hemorrhagic fever Dengue virus. Dengue virus was cultured in baby hamster kidney (BHK-21) cells and was then negative stained for transmission electron microscope (TEM) or immunofluorescent labeled for stochastic optical reconstruction microscopy (STORM). The diameter of the Dengue virus particles is 45-60 nm measured using TEM and is 84±12 nm measured using STORM. After subtraction of the length of the antibody attached to the virus particles, the diameter of Dengue virus particles measured using STORM are close to which measured using TEM. In conclusion, the authors highlight the findings of super-resolution fluorescence microscopy-based Dengue virus studies and their contributions to the understanding of Dengue virus particles. The current advances in super-resolution microscopy may open new avenues for future virology teaching and research.

**Keywords:** Dengues virus, nanoscopy, single-molecule localisation microscopy, STORM, super-resolution fluorescence microscopy.

**Classification number:** 1.3

thước, quan sát hình thái cũng như quá trình lây nhiễm của vi-rút HIV và HPV trên tế bào [11], các vi-rút này thường có kích thước trong khoảng (120-200 nm). Với các vi-rút kích thước nhỏ dưới 100 nm như vi-rút Dengue hay Rota chưa có nhiều nghiên cứu thực hiện bằng biện pháp này.

Sốt Dengue và xuất huyết Dengue là một bệnh do vi-rút lây truyền từ muỗi sang người. Tổ chức Y tế thế giới (WHO) ước tính mỗi năm có khoảng 50-100 triệu người mắc bệnh, phần lớn trong số đó là trẻ em, tỷ lệ tử vong vào khoảng 2,5%. Tại các tỉnh phía Nam Việt Nam, độ tuổi trên 15 mắc SXH đã tăng từ 14% năm 1991 lên đến 30% năm 2004. Tính đến giữa tháng 9/2015 cả nước đã có hơn 30.000 trường hợp mắc SXH, dịch này đã bùng phát tại 50 tỉnh, thành phố trên cả nước với 18 ca tử vong, bệnh đã tăng hơn 76% so với cùng kỳ năm trước [12-14]. Hiện nay, để chẩn đoán lâm sàng SXH Dengue, người ta thường sử dụng phương pháp huyết học (phát hiện sự giảm số lượng bạch cầu, tiểu cầu...) và chẩn đoán xác định bằng phương pháp tìm các kháng thể Dengue-IgM, -IgG trong huyết thanh hoặc định tip huyết thanh bằng kỹ thuật Real-time PCR - hiện đang là phương pháp chẩn đoán SXH hiệu quả nhất vì cho kết quả không chỉ có tác dụng phát hiện chính xác nguyên nhân gây SXH Dengue mà còn xác định được tip của vi-rút Dengue. Điều này giúp các nhà y học và dịch tễ học xác định được các vụ dịch gây ra do tip Dengue nào và tiên đoán được khuynh hướng thay đổi tip gây bệnh theo thời gian [15]. Ví dụ: ở nước ta, khuynh hướng chuyển tip Dengue gây bệnh từ DEN-3 sang DEN-2 và sang DEN-1 đã được dự báo từ năm 2004.

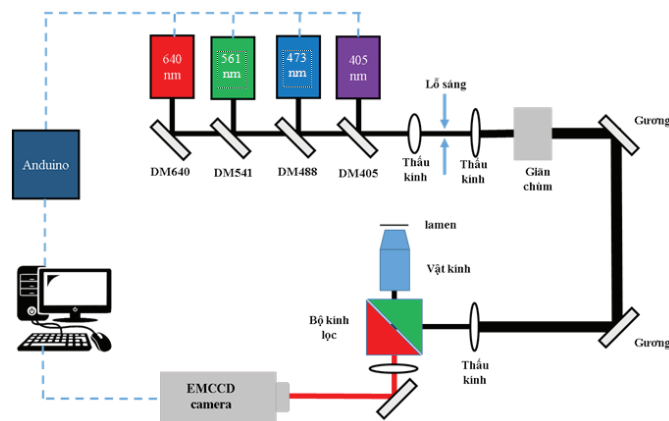
Trong bài báo này, chúng tôi trình bày việc xây dựng hệ thống KHV huỳnh quang siêu phân giải tại Việt Nam và dựng ảnh kỹ thuật siêu phân giải tái tạo quang ngẫu nhiên STORM cho các nghiên cứu vi-rút. Thực nghiệm được thực hiện trên vi-rút SXH Dengue tip 2, được nuôi cấy trong tế bào thận chuột đất vàng BHK-21. Vi-rút SXH Dengue được đánh dấu miễn dịch huỳnh quang với màu CF.647, được sử dụng làm đối tượng hiện ảnh cho kỹ thuật này. Việc phát hiện được vi-rút Dengue tip 2 bằng KHV siêu phân giải đã mở đường cho việc ứng dụng các thiết bị máy móc và phương pháp hiện đại trong chẩn đoán xác định nhanh, chính xác và trong nghiên cứu đào tạo giảng dạy về các vi-rút gây bệnh trên người trong tương lai ở Việt Nam.

## Phương pháp nghiên cứu

### Xây dựng hệ KHV huỳnh quang siêu phân giải

KHV huỳnh quang siêu phân giải được xây dựng dựa trên thân KHV Ti2E của Hãng Nikon có tích hợp mô-đun tự động giữ mặt tiêu PFS (Perfect Focus System). Mô-đun PFS giúp giữ mặt tiêu của KHV ổn định theo trục z trong thời gian dài. KHV được trang bị 3 vật kính 10, 20 và 100x. Vật kính 100x CFI HP APO TIRF được sử dụng để thu ảnh phát quang của các đơn phân tử. Khối laser gồm có 4 laser của Hãng Roithner, trong đó có hai nguồn laser được sử

dụng trong nghiên cứu này. Laser bán dẫn 405 nm là laser kích hoạt, công suất 25 mW, có tác dụng chuyển trạng thái của phân tử phát quang từ OFF sang ON. Laser bán dẫn 640 nm là laser kích thích, công suất 190 mW. Hai laser còn lại có bước sóng phát là 488 và 561 nm. Dưới tác dụng của laser kích thích, phân tử hoặc phát quang hoặc chuyển sang trạng thái OFF. Các laser đã được chuẩn trực sẵn. Bốn laser được ghép vào cùng một đường quang nhờ các kính lọc thông cao LP của Hãng Semrock (hình 1).



**Hình 1. Hệ KHV huỳnh quang siêu phân giải STORM.**

Các chùm laser được cho qua bộ giãn chùm GBE05-A của Hãng Thorlabs. Khi truyền qua bộ giãn chùm, đường kính của các chùm laser đạt 4 mm. Việc giãn chùm laser sẽ giúp làm tăng diện tích chiếu lên mẫu của các chùm. Tiếp đó, các chùm laser đi tới gương phẳng M2. Gương này có thể điều chỉnh góc nghiêng để thay đổi góc vào KHV. Do đó, chúng ta dễ dàng thay đổi giữa các chế độ chiếu sáng epi, HILO (Highly Inclined and Laminated Optical, góc tới lớn và kỹ thuật chiếu lát) - TIR (Total Internal Reflection, phản xạ nội toàn phần). Công suất cực đại của hai laser 405 và 640 nm tại lối vào của KHV lần lượt là 2,4 và 60 mW.

Hệ KHV được xây dựng với các chế độ chiếu sáng là TIR và HILO.

Trong chế độ chiếu sáng TIR ánh sáng kích thích được chiếu xiên với góc tới lớn và bị phản xạ tại bề mặt tiếp xúc giữa kính và mẫu tạo ra sóng tiêu tán kích thích phần mẫu tiếp xúc với lam kính với độ sâu khoảng 100 nm. Trong chế độ HILO, góc nghiêng của chùm sáng nhỏ hơn góc phản xạ toàn phần tại lớp tiếp xúc giữa mẫu và lam kính. Khi đó ta có một chùm sáng song song, hẹp chiếu kích thích lên mẫu. Do chùm kích thích là một dải sáng hẹp nên giảm được nhiễu nền phát ra từ các phân tử không nằm trong mặt tiêu phát quang.

Cặp laser dập tắt quang và kích thích quang được sử dụng tùy thuộc vào chất màu huỳnh quang đánh dấu trên mẫu. Trước khi đi vào KHV, cả hai chùm laser được cho đi qua thấu kính hội tụ tiêu cự 500 mm. Thấu kính này sẽ hội tụ hai chùm laser tại mặt phẳng tiêu sau của vật kính...

Cả 4 laser đều được điều khiển bật tắt, chọn chế độ liên tục hoặc xung. Độ rộng của xung laser được điều khiển bằng các xung TTL (Transistor - Transistor logic) được tạo ra bởi một mạch Arduino mega 2560, nhận lệnh điều khiển từ máy tính.

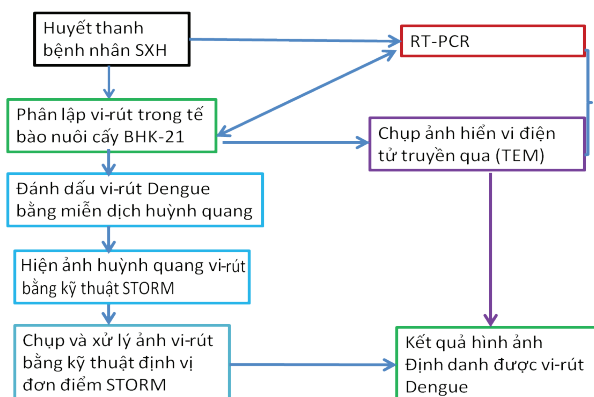
Đầu thu sử dụng một camera EMCCD iXon Ultra 897 với độ nhạy cao, có khả năng phát hiện đơn photon, hiệu suất lượng tử đạt 90% trong vùng 500-700 nm.

Giới hạn phân giải của KHV huỳnh quang siêu phân giải phụ thuộc vào cách thu và xử lý ảnh, ngoài ra còn phụ thuộc vào các tham số khác như sai số của phép định vị đơn phân tử và độ ổn định cơ khí của thiết bị.

### ***Chuẩn bị mẫu vi-rút Dengue cho KHV STORM***

*Nguyên vật liệu hóa chất:* kháng thể đặc hiệu vi-rút Dengue được sử dụng trong nghiên cứu là IgG của chuột do Trung tâm Kiểm soát dịch bệnh Mỹ cung cấp. Kháng thể kháng IgG chuột gắn màu CF.647 (Anti-Mouse IgG (H+L)) là kháng thể của thỏ được mua từ Hãng Invitrogene. Enzyme glucose oxidase và catalase được cung cấp bởi Hãng Invitrogene. Các hóa chất  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , KCl và Tris base được mua của Merck. Các hóa chất mercaptoethylamine (MEA), axit chlohydric, Triton X-100, protein huyết tương bò, glutaraldehyde, paraformaldehyde, glucose, NaCl được mua của Sigma Aldrich. Nước khử ion được tiệt trùng để dùng cho các thí nghiệm đánh dấu và hiện ảnh STORM.

Các bước chuẩn bị mẫu vi-rút Dengue cho KHV STORM được trình bày trên sơ đồ khối ở hình 2. Các mẫu huyết thanh của bệnh nhân SXH được phân lập trong tế bào BHK-21 được nuôi cấy, trong tế bào các vi-rút SXH được nhân lên. Sau đó, các vi-rút trong tế bào được gắn kết với các phân tử màu STORM bởi quy trình đánh dấu miễn dịch huỳnh quang thông thường. Dung dịch hiện ảnh huỳnh quang được đưa vào các giếng chứa tế bào được đánh dấu trước khi chụp ảnh STORM. Các ảnh sau đó được xử lý bằng phần mềm chuyên dụng để được kết quả hình ảnh của vi-rút trong tế bào.



**Hình 2. Sơ đồ quy trình chuẩn bị mẫu vi-rút cho chụp ảnh KHV STORM.**



Dưới đây là chi tiết các bước trong sơ đồ quy trình chuẩn bị mẫu vi-rút cho chụp ảnh KHV STORM.

**Phân lập vi-rút Dengue:** tế bào nguyên bào sợi của thận chuột BHK-21 được nuôi trong môi trường DMEM chứa 10% huyết thanh bê bào thai, trong điều kiện vô trùng ở nhiệt độ 37°C có 5% CO<sub>2</sub>. Mẫu huyết thanh bệnh nhân nghi mắc SXH đã được xác định có vi-rút Dengue típ 2 bằng kỹ thuật Realtime - PCR trước đó [16]. Mẫu huyết thanh dương tính sau đó được phân lập trên tế bào BHK-21 tại Phòng thí nghiệm vi-rút Arbo - Viện Vệ sinh Dịch tễ Trung ương. Mẫu đối chứng âm là các tế bào BHK-21 được nuôi trong cùng điều kiện. Vi-rút Dengue được nuôi cấy trong vòng 48h, sau đó các vi-rút được nhuộm âm bản hoặc được đánh dấu bằng hoá chất miễn dịch huỳnh quang.

**Phương pháp nhuộm bản âm sử dụng TEM:** mẫu là dịch nước nổi tế bào BHK-21 sau 48 giờ phân lập từ huyết thanh bệnh nhân dương tính với vi-rút Dengue típ 2. Phương pháp này được thực hiện trong tủ an toàn sinh học bậc 2 theo phương pháp nhỏ giọt trên giấy parafin, sử dụng lưới đồng 300 mắt được phủ màng collodion và cacbon. Thời gian tiến hành các bước khoảng 5 phút ở điều kiện nhiệt độ phòng thí nghiệm.

Mẫu được cố định bằng dung dịch Glutaraldehyde 1% trong cacodylate 0,1 M. Rửa mẫu bằng dung dịch cacodylate 0,1 M. Nhuộm mẫu bằng dung dịch Uranyl acetate 1%. Để khô mẫu, đọc kết quả dưới TEM 1010-JEOL (Nhật Bản).

**Đánh dấu vi-rút Dengue bằng miễn dịch huỳnh quang:** quy trình đánh dấu huỳnh quang vi-rút Dengue được thực hiện theo quy trình đánh dấu miễn dịch huỳnh quang sử dụng kháng thể sơ cấp là IgG từ chuột đặc hiệu cho protein trên vỏ vi-rút Dengue và kháng thể thứ cấp là kháng thể kháng đặc hiệu cho IgG của chuột có gắn huỳnh quang màu CF.647. Việc đánh dấu miễn dịch huỳnh quang cơ bản theo các bước sau: i) Mẫu được cố định tế bào bằng dung dịch 3% paraformaldehyde và 0,1% glutaraldehyde; ii) Sử dụng dung dịch NaBH<sub>4</sub> 0,1% khử các liên kết không đặc hiệu; iii) Sử dụng dung dịch chặn và đục màng 0,2% BSA và 0,2% triton X 100; iv) Sử dụng dung dịch chặn 3% BSA để chặn những vị trí liên kết không đặc hiệu; v) Đưa kháng thể đặc hiệu kháng vi-rút Dengue típ 2, tiếp theo gắn kết với kháng thể thứ cấp liên kết với phân tử màu CF.647; vi) Rửa sạch các kháng thể dư sử dụng dung dịch cố định tế bào và chống nấm mốc NaN<sub>3</sub> nồng độ 0,02% để mẫu được bảo vệ dài lâu. Sau đánh dấu, mẫu sẽ được bảo quản trong điều kiện lạnh và tối.

**Hiện ảnh huỳnh quang vi-rút bằng kỹ thuật STORM:** dung dịch hiện ảnh STORM bao gồm các enzyme glucose oxidase và catalase, MEA và glucose được pha trong dung dịch đệm Tris, pH 8,5, được chuẩn bị theo quy trình của NIKON [17] và đưa vào các giếng trước khi chụp ảnh KHV huỳnh quang siêu phân giải STORM.

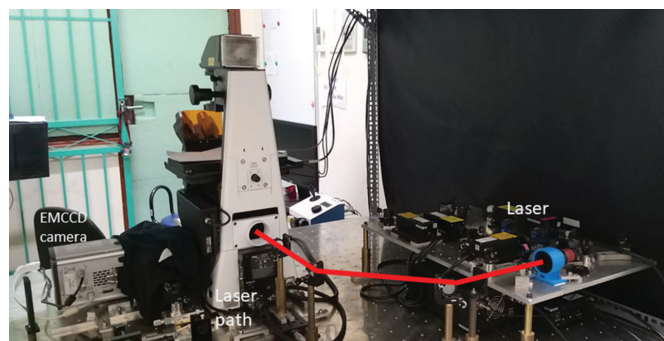
**Chụp và xử lý ảnh vi-rút bằng kỹ thuật định vị đơn điểm:** trước tiên đánh dấu miễn dịch huỳnh quang tế bào, sau đó dung dịch hiện ảnh được đưa vào các giếng tế bào. Chiếu

đồng thời hai laser 640 và 405 nm vào vị trí cần thu ảnh. Liên tục lặp lại quá trình trên cho đến khi đạt được số ảnh cần thu từ 10000 đến 20000, tốc độ khung hình là 30 hình/giây. Tập ảnh trên được xử lý bằng chương trình SMAP [18] để dựng được ảnh huỳnh quang siêu phân giải.

## Kết quả

### Hệ thống kính STORM xây dựng ở Việt nam

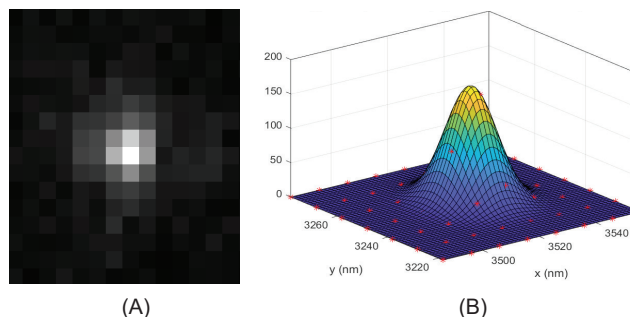
Hình 3 là ảnh của hệ thống KHV SPG (STORM) đã được xây dựng ở Việt Nam với các linh kiện được trình bày chi tiết trong phần phương pháp nghiên cứu. Hệ KHV STORM gồm thân kính Ti2E ECLIPSE, hệ tự điều chỉnh tiêu, bộ dịch chuyển XYZ piezo kết nối quang với nguồn kích thích gồm 4 laser, đầu thu sử dụng một camera siêu nhạy EMCCD. Các thông số của hệ KHV SPG đạt được như sau: độ phân giải ngang x, y được đánh giá xấp xỉ 20 nm. Độ phân giải dọc trục z đạt được trong khoảng 80-150 nm; thời gian lấy mẫu khoảng 10 phút; các mode kích thích hiện ảnh: TIRFM-STORM, 3D STORM; phần mềm điều khiển hệ được viết bằng ngôn ngữ lập trình Labview.



Hình 3. Hệ KHV STORM sử dụng 4 laser kích được kết nối quang với KHV, đầu thu là một camera siêu nhạy EMCCD.

### Giới hạn phân giải của KHV siêu phân giải

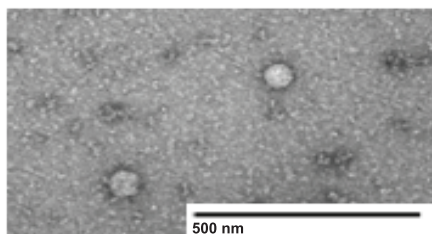
Để đánh giá giới hạn phân giải của KHV, các phân tử màu huỳnh quang rhodamine 6G (Rh6G) được phân tán trên lam kính. Kết quả hình ảnh điểm phát quang của đơn phân tử Rh6G được thể hiện ở hình 4A. Phân bố vị trí được định vị của phân tử Rh6G trên hình 4A là các chấm đỏ trong hình 4B được làm khớp với hàm phân bố Gauss.



Hình 4. Hình ảnh điểm phát quang của đơn phân tử Rh6G. Phân bố vị trí được định vị của phân tử Rh6G trên hình (A) là các chấm đỏ trong hình (B) và được làm khớp với hàm phân bố Gauss.

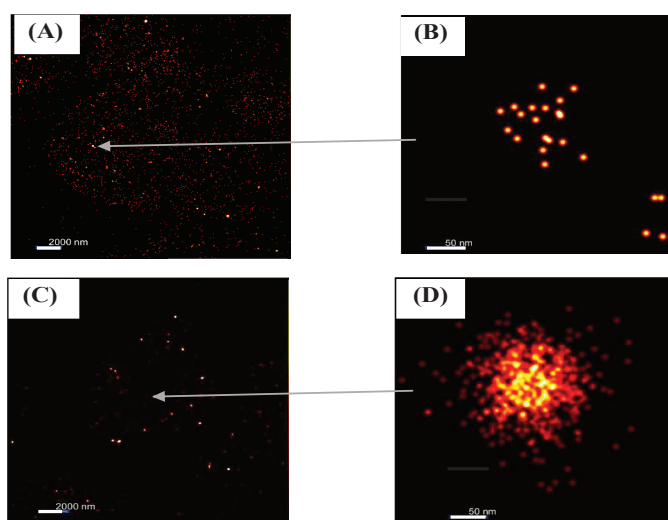
### Kết quả hiện ảnh của vi-rút Dengue

Để thu được hình dạng và đường kính của hạt vi-rút Dengue với độ chính xác cao, các hạt vi-rút Dengue trước tiên được phân tích với TEM. Hình 5 thể hiện hình ảnh của hạt vi-rút Dengue tip 2 được chụp bởi TEM. Trên các ảnh được phân tích, vi-rút Dengue có dạng hình cầu, kích thước đo được nằm trong khoảng 45-60 nm. Số liệu được ghi nhận trên hai mẫu dịch nổi chứa vi-rút Dengue và tổng số khoảng 60 hạt đã được đo.



Hình 5. Hình ảnh vi-rút Dengue tip 2 dưới TEM thang đo 500 nm.

Hình 6 là ảnh thu được của các tế bào BHK-21 có và không có vi-rút Dengue tip 2 chụp bằng kỹ thuật STORM. Hình 6A là ảnh của tế bào BHK-21 nuôi không nhiễm vi-rút, hình 6B là ảnh phóng đại của các chấm sáng trên hình 6A. Kết quả cho thấy các chấm sáng trên hình 6A chỉ là nhiễu nền. Hình 6C là ảnh huỳnh quang của tế bào BHK-21 có nhiễm vi-rút Dengue, các chấm sáng có độ chói cao hơn, sau khi phóng đại các chấm sáng này sẽ thu được ảnh như hình 6D. Hình 6E thể hiện phân bố vị trí được định vị các chấm đỏ, tương ứng với các chấm sáng trên hình D và được làm khớp với hàm phân bố Gauss.



Hình 6. Ảnh STORM của tế bào BHK-21 không có vi rút (A); hình ảnh phóng đại của chấm sáng trên hình A, tương ứng với nhiễu của nền (B); ảnh STORM của vi rút Dengue tip 2 trong tế bào BHK-21 (C); ảnh phóng đại của vi rút tương ứng với từng chấm sáng trên hình B (D); phân bố vị trí được định vị các chấm đỏ trong hình E, tương ứng với các chấm sáng trên hình D và được làm khớp với hàm phân bố Gauss (E).

### Bàn luận

#### Đánh giá sai số của hệ thống KHV huỳnh quang SPG

Sai số của phép định vị đơn phân tử được tính bởi công thức sau [18]:

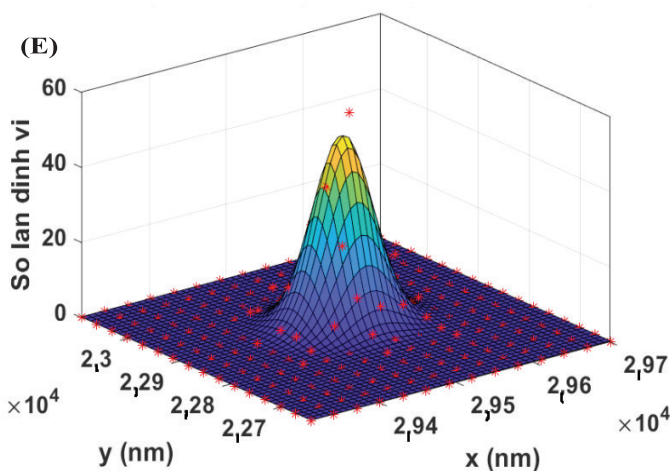
$$\langle (\Delta x)^2 \rangle = \frac{\left(s^2 + \frac{a^2}{12}\right)}{N} + \frac{4\sqrt{\pi}s^3b^2}{aN^2}$$

trong đó:  $\Delta x$  là sai số định vị;  $s$  là độ lệch chuẩn của hàm mở rộng điểm (thường là hàm Gauss) tính theo nano mét;  $N$  là số photon ghi nhận được do một phân tử phát ra;  $b$  là nhiễu nền;  $a$  là kích thước pixel tính theo nano mét. Ta có thể thấy sai số định vị giảm đối với phân tử phát quang mạnh hơn trên nền nhiễu yếu hơn.

Trong kỹ thuật KHV huỳnh quang siêu phân giải định vị đơn phân tử, cần thu hàng nghìn đến hàng trăm nghìn ảnh. Do đó thời gian thu ảnh có thể từ vài phút đến vài chục phút. Trong khoảng thời gian đó, KHV có thể chịu các tác động cơ khí khiến ảnh huỳnh quang thu được bị trôi theo trục x, y và z. Để khắc phục hiện tượng này, mô-đun PFS của Hãng Nikon được trang bị, giúp giữ ổn định mặt tiêu theo trục z. Các thuật toán khử trôi được sử dụng để khử trôi theo trục x, y [19].

#### Đánh giá giới hạn phân giải x, y của STORM

Đối với mỗi phân tử phát quang, 4000 ảnh liên tiếp được thu với tốc độ trung bình khoảng 50 ảnh/giây (hình 4A). Phân tử phát quang trên từng ảnh được định vị bằng phần mềm SMAP [20]. Sau đó, các vị trí của phân tử được xác định trong từng 500 ảnh liên tiếp được sử dụng để xác định phân bố định vị của phân tử đó. Phân bố vị trí này sẽ được làm khớp với hàm Gauss để xác định sai số định vị. Sai số này được xác định bằng độ rộng nửa chiều cao của phân bố thu được. Hình 4B biểu diễn phân bố vị trí của phân tử bằng



các dấu chấm màu đỏ và hàm Gauss được làm khớp. Kết quả cho thấy, hàm Gauss có độ rộng phân bố là 16 nm theo cả hai trục x và y. Với nhiều điểm phát quang khác chúng tôi thu được kết quả tương tự cho phép kết luận, KHV huỳnh quang siêu phân giải xây dựng được có thể đạt độ phân giải xấp xỉ 20 nm với độ lệch chuẩn là  $\pm 2$  nm.

### Kết quả SPG mẫu vi-rút SXH Dengue

Hình 6 (C, D) là hình ảnh của tế bào có vi-rút, chúng ta thấy mật độ chấm sáng của các hạt vi-rút dày hơn so với các mật độ chấm sáng của mẫu không có vi-rút (hình 6 A, B) tương ứng. Kích thước đo được tương ứng trung bình trong khoảng 79-84 nm theo hai chiều x và y được xác định từ 22 chấm sáng của hình 6C cho kích thước của vi-rút theo chiều x =  $79,14 \pm 11,94$  nm và theo chiều y =  $83,8 \pm 11,92$  nm. Độ lệch chuẩn  $\sim 12$  nm này được đóng góp chủ yếu từ sự thay đổi kích thước thực của vi-rút Dengue trong khoảng 45-60 nm. Sau khi đánh dấu miễn dịch huỳnh quang với 2 kháng thể IgG nguyên phát đặc hiệu vi-rút và IgG thứ phát có gắn màu CF.647, kích thước của kháng thể IgG xấp xỉ 14 nm [21]. Như vậy, KHV siêu phân giải của chúng tôi, dựa trên kỹ thuật định vị đơn điểm STORM cho phép có thể quan sát được các cấu trúc kích thước dưới 200 nm và kết hợp với miễn dịch huỳnh quang đặc hiệu giúp định danh được vi-rút. Kỹ thuật này tương đương với hai phương pháp kết hợp trước đây, đó là sử dụng KHV điện tử và kỹ thuật đánh dấu miễn dịch huỳnh quang hoặc RT-PCR.

### Kết luận

Lần đầu tiên, một thiết bị KHV huỳnh quang siêu phân giải đã được xây dựng thành công ở Việt Nam. Độ phân giải hiện tại đạt được giá trị phân giải thông thường của các thiết bị hiển vi siêu phân giải định vị đơn điểm là 20 nm với độ lệch chuẩn là  $\pm 2$  nm. Bằng kỹ thuật chụp ảnh KHV siêu phân giải STORM và đánh dấu miễn dịch huỳnh quang thông thường, chúng ta hoàn toàn có thể chụp ảnh được vi-rút Dengue, có kích thước trung bình xác định được là trong khoảng 79-84 nm với độ lệch chuẩn  $\sim 12$  nm, vốn trước đây chỉ quan sát được bằng TEM. Chỉ với kỹ thuật KHV huỳnh quang siêu phân giải STORM cho phép vừa định danh, vừa xác định được kích thước của vi-rút. KHV siêu phân giải STORM cho phép chẩn đoán nhanh, chính xác loại vi-rút, giúp cho việc hỗ trợ đưa ra liệu pháp điều trị chính xác cho bệnh nhân. Việc phát hiện và định danh được vi-rút SXH Dengue bằng KHV siêu phân giải sẽ đóng góp cho việc nhận dạng xác định nhanh tác nhân vi-rút gây bệnh, đồng thời mở đường cho việc ứng dụng thiết bị hiện đại trong các nghiên cứu sâu về các vi-rút gây bệnh trên người trong tương lai ở Việt Nam.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Y. Oshikane, et al. (2007), "Observation of nanostructure by scanning near-field optical microscope with small sphere probe", *Science and Technology of Advanced Materials*, **8**(3), pp.181-185.
- [2] K. Hoshino, et al. (2012), "Nanoscale fluorescence imaging with

quantum dot near-field electroluminescence", *Appl. Phys. Lett.*, **101**, DOI: 10.1063/1.4739235.

[3] T. Klar, et al. (2000), "Fluorescence microscopy with diffraction resolution barrier broken by stimulated emission", *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **97**(15), pp.8206-8210.

[4] M. Yamanaka, et al. (2014), "Introduction to super-resolution microscopy", *Microscopy*, **63**(3), pp.177-192.

[5] I. Khater, et al. (2020), "A review of super-resolution single molecule localization microscopy cluster analysis and quantification methods", *Patterns*, **1**(12), pp.1-23.

[6] P. Bazylewski, S. Ezugwu, G. Fanchini (2017), "A review of three-dimensional scanning near-field optical microscopy (3D-SNOM) and its applications in nanoscale light management", *Appl. Sci.*, **7**, pp.1-25.

[7] P. Bianchi, et al. (2015), "STED nanoscopy: a glimpse into the future", *Cell Tissue Res.*, **360**, pp.143-150.

[8] E. Betzig (1995), "Proposed method for molecular optical imaging", *Optics Letters*, **20**(3), pp.237-239.

[9] E. Betzig, et al. (2006), "Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution", *Science*, **313**, pp.1642-1645.

[10] M. Rust, et al. (2006), "Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (STORM)", *Nature Methods*, **3**(10), pp.793-796.

[11] Romain F. Laine, et al. (2015), "Structural analysis of herpes simplex virus by optical super-resolution imaging", *Nature Communications*, **6**, p.5980.

[12] <https://www.who.int/vietnam/news/detail/16-07-2019-dengue-increase-likely-during-rainy-season-ministry-of-health-who-warn>.

[13] Kim Lien Pham Thi, et al. (2017), "Incidence of dengue and chikungunya viruses in mosquitoes and human patients in border provinces of Vietnam", *Parasites and Vectors, BioMed. Central.*, **10**(1), p.556.

[14] Dang Thi Thuy, et al. (2020), "Whole genome sequencing and genetic variations in several dengue virus type 1 strains from unusual dengue epidemic of 2017 in Vietnam", *Virology Journal*, **17**(7), DOI: 10.1186/s12985-020-1280-z.

[15] Bộ Y tế (2019), *Quyết định số 3705/2019/QĐ-BYT về việc hướng dẫn chẩn đoán, điều trị sốt xuất huyết Dengue*.

[16] Nguyễn Thị Thu Thủy và cs (2014), "Đặc điểm virus Dengues 1 gây dịch tại Hà Nội 2008-2009", *Tạp chí Y học dự phòng*, **24**, tr.63-69.

[17] <https://wiki.ucl.ac.uk/display/LMCBLMic/STORM+Sample+Preparation>.

[18] E.T. Russell, et al. (2002), "Precise nanometer localization analysis for individual fluorescent probes", *Biophysical Journal*, **82**, pp.2775-2783.

[19] Sian Culley, et al. (2018), "SRRF: universal live-cell super-resolution microscopy", *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, **101**, pp.74-79.

[20] Jona Ries (2020), "SMAP: a modular super-resolution microscopy analysis platform for SMLM data", *Nature Methods*, **17**, pp.870-872.

[21] G.W. Nicholas, et al. (2017), "Orientation and characterization of immobilized antibodies for improved immunoassays", *Biointerphases*, **12**(2), p.02D301.