

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC



NGUYỄN VŨ ÁNH NGUYỆT

**NGHIÊN CỨU ĐỘNG HỌC CÁC PHÂN TỬ
PROTEIN TRONG TẾ BÀO SỐNG BẰNG
PHƯƠNG PHÁP THEO DÕI ĐƠN PHÂN TỬ**

LUẬN VĂN THẠC SĨ VẬT LÝ

Thái Nguyên, năm 2018

ĐẠI HỌC THÁI NGUYÊN
TRƯỜNG ĐẠI HỌC KHOA HỌC



NGUYỄN VŨ ÁNH NGUYỆT

**NGHIÊN CỨU ĐỘNG HỌC CÁC PHÂN TỬ
PROTEIN TRONG TẾ BÀO SỐNG BẰNG
PHƯƠNG PHÁP THEO DÕI ĐƠN PHÂN TỬ**

Chuyên ngành: Quang học

Mã số: 8440110

LUẬN VĂN THẠC SĨ VẬT LÝ

Cán bộ hướng dẫn khoa học:

TS. VŨ XUÂN HÒA

Thái Nguyên, năm 2018

LỜI CẢM ƠN

Lời đầu tiên, tôi xin bày tỏ lòng kính trọng và biết ơn sâu sắc tới thầy giáo, TS. Vũ Xuân Hòa đã trực tiếp hướng dẫn, giúp đỡ tôi trong suốt quá trình thực hiện đề tài.

Tôi xin gửi lời cảm ơn chân thành tới Ban Giám hiệu Trường THPT Chuyên Hưng Yên, nơi tôi công tác, tới Ban lãnh đạo trường Đại học khoa học thuộc Đại học Thái Nguyên đã tạo nhiều điều kiện thuận lợi cho tôi trong quá trình học tập.

Cuối cùng, tôi xin gửi lời cảm ơn đến gia đình, bạn bè, những người đã luôn bên tôi, động viên và khích lệ tôi trong quá trình thực hiện đề tài nghiên cứu của mình.

Mặc dù em đã cố gắng để hoàn thành đề tài nhưng không tránh khỏi những thiếu sót nhất định.

Em rất mong được sự đánh giá, nhận xét và đóng góp ý kiến của các thầy cô giáo và các bạn để đề tài được hoàn thiện hơn.

Xin chân thành cảm ơn!

Thái Nguyên, tháng 5 năm 2018

Học viên

NGUYỄN VŨ ÁNH NGUYỆT

MỤC LỤC

DANH MỤC BẢNG.....
DANH MỤC HÌNH.....
DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU VIẾT TẮT.....
CHƯƠNG 1: TỔNG QUAN.....	2
1.1. Phân tử Poly-glycoprotein	2
1.2. Chuyển động dịch chuyển ngẫu nhiên (Brownian)	5
1.3.Kính hiển vi quang học[7]	7
1.3.1.Khái niệm cơ bản về kính hiển vi quang học	7
1.3.2. Cấu tạo chung của kính hiển vi quang học.....	7
1.3.3. Nguyên lý hoạt động chung của kính hiển vi quang học	8
1.3.3.1. Nguyên tắc phóng đại ảnh của kính hiển vi	8
1.3.3.2.Khẩu độ số.....	12
1.4.2.3. Độ phóng đại	13
1.3.3.4.Độ phân giải	14
1.3.4. Một số loại kính hiển vi quang học	16
1.3.4.1. Kính hiển vi tương phản pha (Phase Contrast Microscopy[9].....	16
1.3.4.2. Kính hiển vi huỳnh quang(Fluorescence microcope[10]	17
1.3.4.3. Kính hiển vi phản xạ nội toàn phần (total internal reflection microcope - TIRM).....	20
CHƯƠNG II.....	22
THỰC NGHIỆM VÀ PHƯƠNG PHÁP THEO DÕI ĐƠN PHÂN TỬ.....	22
2.1. Chuẩn bị mẫu	22
2.1.1. Nuôi cấy tế bào P-glycoprotein	22
2.1.2. Tổng hợp P-glycoprotein trong màng tế bào.....	23
2.2. Cấu hình quang học kính hiển vi huỳnh quang phản xạ nội toàn phần	24
2.3. Phương pháp theo dõi đơn phân tử P-glycoprotein trong tế bào MDCKII	24
2.3.1. Cách tiến cận	25
2.3.2. Quy trình theo dõi một phân tử trong chất lỏng	25
2.3.2.1. Ghi một video dưới kính hiển vi huỳnh quang phản xạ nội toàn phần (TIRFM)	26
2.3.2.2. Xác định các vị trí các PGP trên ảnh.....	27
2.3.2.3. Theo dõi sự dịch chuyển các phân tử protein.....	27
2.3.2.4 Phân tích dữ liệu.....	31
CHƯƠNG III	33

3.1. Kết quả về tổng hợp protein trong màng tế bào	33
3.2. Hình thái màng tế bào MDCKII	36
3.3. Đơn phân tử protein dưới kính hiển vi huỳnh quang phản xạ nội toàn phần (TIRFM)	38
3.4. Các thông số động học của protein PGP-GFP	39
3.4.1. Kết quả tế bào 1	40
3.4.1.1. Hệ số khuếch tán	40
3.4.1.2. Quãng đường dịch chuyển.....	42
3.4.1.3. Vận tốc dịch chuyển	44
3.4.2. Kết quả tế bào 2.....	45
3.4.3. Kết quả tế bào 3.....	47
KẾT LUẬN	49
TÀI LIỆU THAM KHẢO.....	51

DANH MỤC BẢNG

Bảng 1.1. Liệt kê sự kết hợp độ phóng đại và khẩu độ số của vật kính và thị kính cho độ phóng đại nằm khoảng giới hạn cho phép.....13

Bảng 1.2. Sự liên quan giữa độ phân giải với khẩu độ số và độ phóng đại.....15

Bảng 2.1. Thời gian kích thích và nồng độ BS dung trong tổng hợp protein.....24

DANH MỤC HÌNH

Hình 1.1. Hình ảnh phân tử P-glycoprotein trong màng tế bào.....	4
Hình 1.2. Cấu trúc của P-glycoprotein	4
Hình 1.3. Các thành phần cấu tạo bên trong kính hiển vi quang học	8
Hình 1.4. Sơ đồ tạo ảnh của kính hiển vi.....	8
Hình 1.5. Sơ đồ kính hiển vi giới hạn chiều dài ống	10
Hình 1.6. Cấu hình tia truyền trong kính hiển vi hiệu chỉnh vô cùng	10
Hình 17. Sơ đồ của kiểu chiếu sáng Kohler.....	12
Hình 1.8. Khẩu độ số của vật kính.....	12
Hình 1.9. Khẩu độ số phụ thuộc tiêu cự của vật kính.....	13
Hình 1.10. Giới hạn phân giải.....	15
Hình 1.11 Sự phụ thuộc của đĩa Airy vào khẩu độ số	15
Hình 1.12	16
Hình 1.13. Ảnh qua kính hiển vi trường sáng (trái) và tương phản pha (phải)	17
Hình 1.14. Đường đi ánh sáng kính thích và phát xạ qua kính lọc lập phương trong kính hiển vi huỳnh quang	18
Hình 1.15. Cấu tạo của kính hiển vi huỳnh quang.....	19
Hình 1.16. Ảnh tế bào qua kính hiển vi huỳnh quang	19
Hình 1.16.1. Nguyên lý phản xạ nội toàn phần	20
Hình 1.16.2. Cấu hình của kính hiển vi phản xạ nội toàn phần.....	20
Hình 1.16.3. Kính hiển vi phản xạ nội toàn phần.....	21
Hình 1.17. Hình ảnh bề mặt tế bào dưới kính hiển vi phản xạ nội toàn phần	21
Hình 2.1. Ảnh chụp một số đĩa thủy tinh dung để nuôi cấy tế bào.....	22
Hình 2.2. Cấu hình quang học của kính hiển vi huỳnh quang phản xạ nội toàn phần [10].....	24
Hình 2.3. Sơ đồ minh họa quy trình theo dõi đơn phân tử	26
Hình 2.4. Video gồm 100 ảnh của 1 tế bào MDCKII dưới kính hiển vi huỳnh quang phản xạ nội toàn phần. Các PGP là các đốm sáng trong ảnh	26
Hình 2.5. Mở video	27
Hình 2.6. Ảnh PGP trong tế bào MDCKII dưới kính hiển vi huỳnh quang phản xạ nội toàn phần với thông số: radius=3, cutoff=3, percentile=0,1	28

Hình 2.7. Ảnh PGP trong tế bào MDCKII dưới kính hiển vi huỳnh quang phản xạ nội toàn phần với thông số: radius=3, cutoff=3, nhưng với percentile=0,1(trái) và percentile=0,4 (phải).....	28
Hình 2.8. Quan sát tất cả các quỹ đạo của PGP. Phần đóng khung màu xanh được phóng to đến hình bên phải để thấy rõ hơn các quỹ đạo dịch chuyển của PGP.....	29
Hình 2.9. Thông tin quỹ đạo xuất ra từ thuật toán của Mosaic trong không gian 2 chiều.....	30
Hình 2.10. Các tọa độ x và y tạo thành các điểm ảnh ở mỗi khung hình (frame) cho 1 quỹ đạo của phân tử.....	31
Hình 2.11. Quỹ đạo chuyển động của 1 PGP theo thời gian	31
Hình 3. 1. Một chuỗi các ảnh tế bào MDCKII được chụp cùng 1 vị trí (chồng nhau) dưới kính hiển vi tương phản pha và huỳnh quang tương ứng với các thời điểm khác nhau 1h; 12h; 18h và 23h40 cho 4 nồng độ BS khác nhau: a) 0,1 mM; b) 0,5 mM; c) 1mM và d) 2mM.....	35
Hình 3. 2. Cường độ huỳnh quang của các tế bào MDCKII với các nồng độ BS (0,1mM; 0,5mM; 1mM và 2mM) tại các thời điểm khác nhau.....	36
Hình 3. 3. Quy trình tổng hợp protein PGP-GFP trong màng tế bào MDCKII.....	36
Hình 3. 4. Hình thái màng tế bào MDCKII. a) Ảnh chụp dưới kính hiển vi huỳnh quang và b) là ảnh kính hiển vi tương phản giao thoa tương ứng, c) ảnh chụp dưới kính hiển vi tương phản pha và d) là ảnh chụp dưới kính hiển vi trường sáng.....	37
Hình 3. 5. Hình ảnh của một tế bào chồng khít dưới kính hiển vi huỳnh quang (trái) và TIRFM (phải). Các hạt PGP-GFP được bộc lộ chi tiết trên bề mặt của tế bào, phần phóng to bên phải cho thấy chi tiết hơn về protein này.	38
Hình 3. 6. Phân biệt một phân tử duy nhất protein PGP-GFP và nhóm phân tử. a) là tín hiệu phát quang của 1 phân tử duy nhất và b) là tín hiệu một nhóm phân tử. c) và d) là giản đồ minh họa cho hai loại phân tử này tương ứng.....	39
Hình 3. 7. Theo dõi và phân tích một phân tử PGP-GFP (a). Quỹ đạo dịch chuyển (x(t), y(t)) trong thời gian 1 giây (b) và cường độ tương ứng trong khoảng thời gian đó là (c).....	40
Hình 3. 8. Bình phương dịch chuyển trung bình (MSD) của đơn phân tử PGP-GFP theo thời gian	41

- Hình 3. 9.** Hai phân bố hệ số khuếch tán tương ứng với 2 loại phân tử: đơn phân tử PGP-GFP (màu đỏ) và nhóm phân tử PGP-GFP (màu xanh) 42
- Hình 3. 10.** Bình phương dịch chuyển trung bình (MSD) của nhóm phân tử PGP-GFP theo thời gian. Sử dụng phương trình (2.2 ở chương 2) để làm khớp số liệu thực nghiệm, ta thấy MSD gồm 2 phân đoạn tương ứng với các giá trị hệ số khuếch tán $D1 = 0,057 \pm 0,00628 \mu m^2/s$ và $D2 = 0,495 \pm 0,0934 \mu m^2/s$ 42
- Hình 3. 11.** Hai quỹ đạo chuyển động của PGP-GFP tương ứng một đơn phân tử duy nhất (màu đỏ) và nhóm phân tử (màu xanh) chuyển động trong mặt phẳng (x,y) trong thời gian $t=1,05s$ 43
- Hình 3. 12.** Hai phân bố dịch chuyển tương ứng với hai loại phân tử trong cùng một tế bào: đơn phân tử (màu đỏ) và nhóm phân tử (màu xanh) 44
- Hình 3. 13.** Phân bố vận tốc của hai loại phân tử trong cùng một tế bào. Kết quả vận tốc trung bình của các đơn phân tử bằng $1,33 \mu m/s$ và nhóm phân tử bằng $1,14 \mu m/s$ 44
- Hình 3. 14.** Kết quả các thông số động học của các phân tử protein trong tế bào thứ 2 đã xử lý. Các phân tử protein PGP-GFP phát huỳnh quang trong màng tế bào dưới ảnh TIRFM với nhiễu nền rất thấp a). Các phân bố động học về hệ số khuếch tán và quãng đường dịch chuyển được thể hiện trong hình b và c..... 46
- Hình 3. 15.** Kết quả các thông số động học của các phân tử protein trong tế bào thứ 3 đã xử lý. Các phân tử protein PGP-GFP phát huỳnh quang trong màng tế bào dưới ảnh TIRFM với nhiễu nền rất thấp a). Các phân bố động học về hệ số khuếch tán và quãng đường dịch chuyển được thể hiện trong hình b và c). d)-phân bố của vận tốc 47

DANH MỤC CÁC KÝ HIỆU VIẾT TẮT

STT	Ký hiệu	Tên đầy đủ	Tên tiếng Việt
1	PGP	P-glycoprotein	
2	MDCKII	Madin Darby Canine Kidney	Tế bào ung thư thận chó
3	GFP	Green fluorescent protein	Protein phát sáng huỳnh quang
4	TIRFM	Total internal reflection fluorescence microscopy	Kính hiển vi huỳnh quang phản xạ nội toàn phần
5	MSD	Mearn square displacement	Bình phương dịch chuyển trung bình