

# Kính hiển vi huỳnh quang

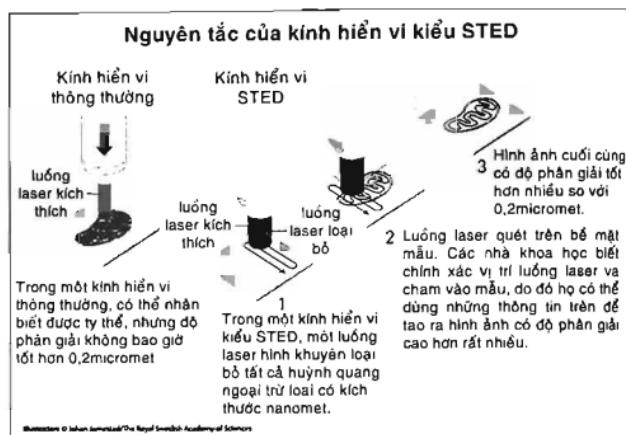
Ba nhà Nobel 2014: Eric Betzig, Stefan W. Hell, William E. Moerner, mỗi người một phương thức đã góp phần tăng sự phân giải của kính hiển vi quang học huỳnh quang.

Nhờ các nghiên cứu của 3 nhà Nobel hóa học trên, con người đã có thể quan sát mọi vật sống, các protein trong tế bào sống mà không phải tiêu hủy hay định hình chúng. Theo Sten Lidin, nhà nghiên cứu Viện đại học Lund và cũng là Ủy viên Ủy ban Nobel 2014, sinh học và hóa học đã hỗ trợ cho nhau.

Nhờ nghiên cứu của 3 nhà Nobel hóa học 2014, kính hiển vi quang học có thể trở thành kính hiển vi nano, vượt giới hạn phân giải 0,2micromet. Thật vậy, nhà vật lý học Đức Ernst Abbe, một trong các nhà tiên phong trong lĩnh vực kính hiển vi quang học nghĩ rằng: các kính hiển vi quang học không thể nào quan sát các vật thể nhỏ hơn 0,2micromet.

Theo E. Abbe, kính hiển vi quang học chỉ cho thấy hình dạng một ty thể, nhưng không thể quan sát virus, protein hay các phân tử nhỏ.

Tuy nhiên, ba nhà Nobel hóa học 2014 đã chứng minh ngược lại nhờ các phương thức mới: phát sáng các phân tử huỳnh quang.



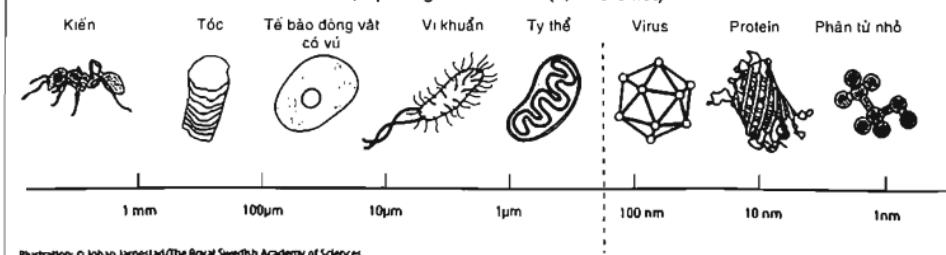
Stefan Hell đã đưa các phân tử huỳnh quang vào mẫu vật nghiên cứu. Hell đã gán các phân tử huỳnh quang dán dấu vào mẫu sinh học cần nghiên cứu.

Sau đó, sử dụng một chùm laser để chiếu sáng mẫu nghiên cứu. Năng lượng của laser được hoàn lại bởi các phân tử huỳnh quang dưới dạng phát quang. Kỹ thuật STED này cho phép nhận dạng một ty thể (một bộ phận trong tế bào cung cấp năng lượng cần thiết cho hoạt động bình thường của các tế bào), nhưng không quan sát được các chi tiết của cấu trúc ty thể.

Vào năm 1994, Stefan Hell đã đăng công trình trên dưới tựa đề *"Giảm kích thích phát xạ"* ("Stimulated emission depletion" - viết tắt là STED). Đây là nguyên tắc của kính hiển vi STED. Đến năm 2000, Stefan Hell cải tiến kỹ thuật kính hiển vi STED bằng cách đưa 2 luồng laser, cách khoảng thời gian rất ngắn vào mẫu vật nghiên cứu. Tia laser đầu kích thích phân tử huỳnh quang phát sáng. Tia thứ hai loại bỏ huỳnh quang, ngoại trừ các hạt có kích thước siêu nhỏ.

**Kết quả:** Sau khi quét qua mẫu, nhận thấy hình ảnh có độ phân

Giới hạn phân giải theo Abbe (0,2micromet)



# siêu phân giải

↔ TS. PHẠM VĂN TẤT

giải tốt hơn giới hạn mà Abbe đã đưa ra ( $0,2\mu\text{m}$ ).

**Nguyên tắc của kính hiển vi đơn phân tử**

W. E. Moerner đã tìm ra được một kỹ thuật để do sự hấp thu ánh sáng của một phân tử.

Moerner phát hiện: nếu chiếu sáng một phân tử giống như GFP (một protein phát quang trich từ sữa) thường sử dụng để quan sát dưới kính hiển vi với bước sóng chính xác 405 nanomet, phân tử này có khả năng phát và tắt sáng tùy thích.

Eric Betzig nghiên cứu về một тип mới kính hiển vi quang học gọi là "trường nhìn gần". Kỹ thuật này không phải là quan sát ánh sáng phân chieu bởi vật mẫu nghiên cứu mà quan sát một nguồn ánh sáng thoáng qua gọi là sóng mờ dần. Các bước sóng này có mặt ở

gần bề mặt của môi trường, lan ra song song với bề mặt và yếu dần nhanh chóng.

Phối hợp 2 kỹ thuật, W. E. Moerner và E. Betzig đã có được một kỹ thuật độc đáo để giám ánh sáng nền, nếu tắt cả các phân tử dưới ánh sáng của kính hiển vi tỏa sáng cùng một lúc, người quan sát mẫu vật chỉ nhận thấy các vật khó phân biệt.

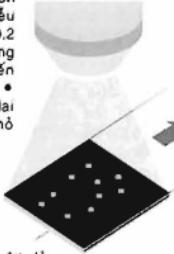
Bí quyết là phát sáng từng phân tử một của một mẫu nghiên cứu. Các phân tử này cách xa nhau. Như vậy, mới có thể phân biệt các phân tử.

Hai nhà nghiên cứu này chụp một vị trí nhiều lần, mỗi lần cho một vài phân tử phát sáng. Khi chồng các hình ảnh dày lên nhau, sẽ có một độ phân giải cao.

Năm 2006, E. Betzig đã sử dụng phương pháp này lần đầu tiên.

## Nguyên tắc của kính hiển vi đơn phân tử

1. Một xung ánh sáng yếu kích hoạt một phần của tất cả các protein phát huỳnh quang. Khoảng cách giữa các protein này lớn hơn giới hạn nhiễu xạ của Abbe là  $0,2\text{ micromet}$ . Chúng sáng lên cho đến khi mờ đi, tại điểm \* qui trình được lặp lại trên một nhóm nhỏ protein mới.



Kính hiển vi

2. Những hình mờ nhạt này được xử lý dựa trên lý thuyết xác suất làm chúng sắc nét hơn.

Khoảng cách giữa các protein  $>0,2\text{ micromet}$



3. Khi tất cả các ảnh được xếp chồng lên nhau, một hình có độ phân giải cao được tạo thành, từng protein riêng lẻ có thể nhận diện được.

Illustration: © Johan Jarnestad/The Royal Swedish Academy of Sciences



• **Stefan W. Hell** mang quốc tịch Đức, sinh năm 1962 tại Romania, nhận bằng tiến sĩ năm 1990 tại Trường đại học Heidelberg. Hiện ông đang làm giám đốc Viện nghiên cứu hóa sinh Max Planck (Đức) và cũng đang công tác tại Trung tâm nghiên cứu ung thư Đức.



• **William E. Moerner**, công dân Mỹ, sinh năm 1953 tại California, nhận bằng tiến sĩ năm 1982 tại Trường đại học Cornell. Hiện ông là giáo sư hóa học và giáo sư vật lý ứng dụng tại Trường đại học Stanford, California (Hoa Kỳ).

