

# TỔNG QUAN VỀ NGHIÊN CỨU SIÊU CẤU TRÚC MÔ Y SINH HỌC TRÊN KÍNH HIỂN VI ĐIỆN TỬ TRUYỀN QUA

Lê Tài Thế<sup>1,2,✉</sup>, Trần Ngọc Minh<sup>2</sup>, Trần Danh Nhân<sup>1</sup>

Tường Phi Vương<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Viện 69, Bộ Tư lệnh Lăng

<sup>2</sup>Trường Đại học Y Hà Nội

*Trong lĩnh vực nghiên cứu y sinh học, phân tích hình thái mô và tế bào bằng kính hiển vi điện tử truyền qua là một phương pháp lý tưởng để nghiên cứu cấu trúc nội bào và các loại vật chất sinh học khác. Nó cung cấp hình ảnh chân thực với độ phân giải chỉ vài nanomet sẽ hỗ trợ quá trình nghiên cứu, đánh giá những biến đổi, tổn thương siêu cấu trúc của mô, tế bào. Tuy nhiên, để hiển thị được hình ảnh một cách rõ nét, sát thực nhất, các nhà nghiên cứu phải đảm bảo rằng mẫu mô y sinh học cần được chuẩn bị tốt qua các bước đòi hỏi kỹ thuật và độ chính xác cao. Trong bài tổng quan này, chúng tôi mong muốn cung cấp thông tin tổng quan về phương pháp nghiên cứu siêu cấu trúc mô y sinh học bằng kính hiển vi điện tử truyền qua, đồng thời giúp những người mới hình dung tổng thể về phương pháp nghiên cứu siêu cấu trúc các mẫu y sinh học.*

**Từ khoá:** Hiển vi điện tử truyền qua, siêu cấu trúc mẫu sinh học.

## I. ĐẶT VẤN ĐỀ

Kính hiển vi điện tử (Electron Microscopy – EM) ra đời vào những năm 1930 là loại kính cho phép nghiên cứu mẫu ở cấp độ siêu cấu trúc (SCT) và mới đây thậm chí là cấp độ nguyên tử. Điều này mang đến những bước tiến vượt trội trong khoa học nói chung và y sinh học nói riêng. Từ khởi điểm đó, nhiều loại kính hiển vi điện tử đã được thiết kế và cải tiến nhằm mục đích cải thiện chất lượng hình ảnh và nâng cao độ phân giải góp phần để hiểu rõ hơn sự sống quanh ta. Một số loại hiện đại như: Kính hiển vi điện tử truyền qua (Transmission Electron Microscopy -TEM); Kính hiển vi điện tử quét (Scanning Electron Microscopy – SEM); Kính hiển vi điện tử phản hồi (Reflective Electron Microscopy); Kính hiển vi điện tử quét truyền qua (Scanning Transmission Electron Microscopy (STEM)).<sup>1</sup>

Hiện nay ở Việt Nam, nghiên cứu SCT mẫu mô y sinh học (biomedical samples -BMS) chủ yếu sử dụng kính SEM và TEM. Trong đó, SEM sử dụng chùm electron quét để thu thông tin bề mặt mẫu, TEM hoạt động với điện áp gia tốc cao mang đặc tính đâm xuyên qua mẫu nên có thể quan sát thấy hầu như tất cả cấu trúc bên trong mẫu. TEM hữu ích cho quan sát các thành phần của tế bào như bộ khung tế bào, hệ thống màng, các bào quan, tiểu thể cũng như các cấu trúc chuyên biệt trong các tế bào biệt hóa, ví dụ như vi nhung mao, phức hệ tiếp hợp, tiểu thể thần kinh...<sup>2</sup> Mô sinh học khác với các mẫu vô cơ hay các loại vật liệu ở chỗ chúng khá mềm, cấu tạo có nhiều thành phần hữu cơ, nhiều nước, dễ bị hỏng nên không thể soi trực tiếp chúng trên TEM. Đặc điểm thu hình ảnh của TEM khi chùm electron đi xuyên qua mẫu và các cấu trúc bên trong kính đều phải được đặt trong môi trường chân không cao để tránh ảnh hưởng do va chạm giữa các điện tử với các phân tử trong không khí bên trong nên đòi hỏi yêu cầu về chất lượng tiêu bản rất cao. Mẫu

Tác giả liên hệ: Lê Tài Thế

Viện 69, Bộ Tư lệnh Lăng

Email: bsthelt07@gmail.com

Ngày nhận: 27/02/2025

Ngày được chấp nhận: 21/03/2025

phải đủ mỏng và không bị biến dạng. Thông thường, độ dày của lát cắt mẫu không quá 100nm, khoảng 60 - 80nm tùy loại mẫu.<sup>2,3</sup> Đồng thời, mẫu phải được khử nước hoàn toàn trước khi soi, nếu không môi trường chân không sẽ hút sạch dấu vết của nước và phá hủy mẫu, hoặc chùm electron sẽ làm nước bị phân giải, bay hơi gây mất cấu trúc, biến dạng thậm chí có thể hủy hoại mẫu.<sup>4</sup> Vì vậy, để hiển thị được hình ảnh tốt nhất của mẫu đặt ra những yêu cầu khắt khe trong công tác chuẩn bị mẫu, bởi một sai sót nhỏ ở bất cứ khâu nào đều có thể dẫn đến sai lệch rất lớn ở kết quả khi soi mẫu.

Ở Việt Nam, hiện nay có rất ít cơ sở nghiên cứu chuyên sâu về SCT mẫu y sinh học và chưa có nhiều văn bản nêu đầy đủ, chi tiết quy trình chuẩn bị mẫu mô y sinh học cho kính TEM. Bài tổng quan này nhằm cung cấp thông tin và cập nhật những kiến thức nền tảng về kính TEM, trình bày quy trình chuẩn bị mẫu mô y sinh học cho TEM và các ứng dụng thực tiễn, hỗ trợ nhà nghiên cứu mới tiếp cận kỹ thuật này. Từ đó, đảm bảo tốt cho công tác nghiên cứu, đánh giá và phân tích hình ảnh của mẫu mô y sinh học bằng kính TEM.

## II. NỘI DUNG TỔNG QUAN

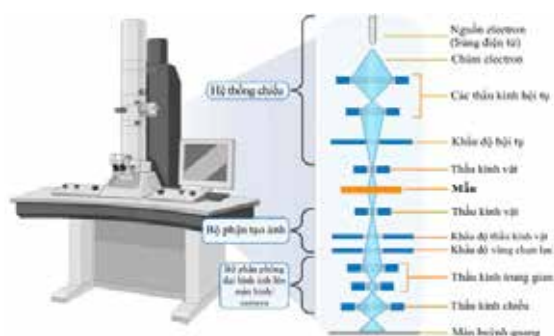
Những nội dung trong phần tổng quan này được nghiên cứu và tổng hợp từ các nguồn tài liệu, tạp chí tin cậy như PubMed, Scopus, và Web of Science... với từ khoá là “Transmission electron microscopy”, “Biomedical sample preparation”, “ultrastructure biomedical sample” tập trung vào các nghiên cứu, báo cáo từ khoảng 2010 đến 2023.

### 1. Tổng quan về kính hiển vi điện tử truyền qua

Kính hiển vi điện tử truyền qua (TEM) là một thiết bị nghiên cứu SCT, sử dụng chùm điện tử được gia tốc với điện thế cao, cùng hệ thống thấu kính từ và khẩu độ để chiếu xuyên qua

mẫu vật, tạo ảnh với độ phóng đại lớn có thể tới hàng triệu lần ảnh có thể tạo ra trên màn huỳnh quang, hay ảnh chụp bằng các máy kỹ thuật số. Kính TEM được thiết kế và chế tạo đầu tiên vào những năm đầu của thập niên 30 thế kỷ XX bởi hai nhà khoa học Ernst Ruska và Max Knoll, tuy nhiên phải gần một thập kỷ sau đó, hình ảnh chụp TEM đầu tiên của tế bào nhân thực mới được ghi lại bởi Keith Porter.<sup>5</sup> Kể từ đó kính TEM là thiết bị và kỹ thuật không thể thiếu trong công tác nghiên cứu cấu trúc mô và tế bào ở cấp độ nanomet.

Cấu tạo của TEM gồm: Hệ thống chiếu sáng (súng điện tử và các thấu kính hội tụ), buồng mẫu, hệ thống tạo ảnh (các thấu kính) và hệ thống hút chân không.<sup>5</sup> Ở trên cùng của cột kính là súng bắn điện tử (electron gun) được gắn với nguồn điện cao thế để thiết lập động năng cho chùm điện tử. Điện thế gia tốc phù hợp cho các mẫu có độ dày điển hình dao động từ 100kV tới 300kV, đối với các mẫu mỏng thì nên dùng điện thế thấp hơn.<sup>6</sup> Cột kính bao gồm một chuỗi các thấu kính điện từ, khẩu độ để hội tụ chùm điện tử lên mẫu và bộ phận khuếch đại hình ảnh lên màn quan sát (hoặc đầu thu) (Hình 1).



Hình 1. Cấu tạo cột kính TEM

Nguyên lý hoạt động của TEM là khi các điện tử xuất phát từ catốt đi về phía anốt được gia tốc tạo thành chùm điện tử năng lượng cao, va chạm với mẫu trên đường đi và tạo ra nhiều loại tín hiệu. Với TEM, chùm điện tử được tạo

ra bởi các súng điện tử, thường sử dụng sợi đốt vật liệu vonfram hoặc tinh thể  $\text{LaB}_6$ .<sup>5</sup>

Năng lượng điện tử  $E$  liên hệ điện thế gia tốc  $U$  theo công thức:

$$E = \frac{mv^2}{2} = \frac{p^2}{2m} = eU$$

Với  $e$  là điện tích của một điện tử ( $1.602 \times 10^{-19} \text{ C}$ );  $m$  là khối lượng điện tử ( $9.109 \times 10^{-31} \text{ kg}$ )

Theo De Broglie, các điện tử chuyển động như một sóng, có bước sóng liên hệ với động lượng  $p$  theo hệ thức:  $\lambda = h/p$ .

Do đó:  $\lambda = h/\sqrt{2meU}$  (với  $h$  là hằng số Planck)

Như vậy, với điện thế gia tốc  $U = 200\text{kV}$ , ta sẽ có một sóng có bước sóng  $\lambda = 0,00251\text{nm}$ , ngắn hơn rất nhiều so với ánh sáng khả kiến ( $380 - 760\text{nm}$ ) hay tia X ( $0,01 - 10\text{nm}$ ). Bước sóng ngắn giúp tăng khả năng đâm xuyên, giảm nhiễu xạ từ đó cho phép TEM quan sát được cấu trúc rất nhỏ với độ phân giải cao.

Hình ảnh của TEM sử dụng thông tin chứa trong sóng điện tử thoát ra từ mẫu để tạo ảnh theo cơ chế tương phản khối lượng và độ dày mẫu. Độ tương phản giữa hai vùng liền kề trong ảnh TEM có thể hiểu là sự khác biệt về mật độ electron trên mặt phẳng ảnh. Do đó, chất lượng ảnh phụ thuộc hoàn toàn vào sự chuẩn bị mẫu và quy trình của nhà nghiên cứu đưa ra, sự thành thạo tay nghề của đội ngũ kỹ thuật viên am hiểu đã được đào tạo và thực hành tốt.

## 2. Mục đích phân tích SCT trên TEM và các lĩnh vực y sinh học nghiên cứu

Theo khả năng phân giải của TEM giúp quan sát các đối tượng khác nhau ở các mức độ phân giải khác nhau, từ kích thước angstrom của phức hợp đại phân tử đến cấp độ nanomet cho phức hợp dưới tế bào và tế bào đến micromet cho hình thái mô.<sup>4</sup>

Về mục đích phân tích trên kính TEM, thứ

nhất là phân tích SCT mẫu vật ở cấp độ siêu nhỏ cỡ nanomet mà không thể kiểm tra bằng các thiết bị hoặc kỹ thuật khác. Mục đích thứ hai của TEM là phát hiện miễn dịch tế bào của các kháng nguyên được xác định về mặt sinh hóa bên trong tế bào. Các lĩnh vực chính sử dụng kính hiển vi điện tử cho nghiên cứu là y học lâm sàng, y học cơ sở, y học thực hành, vi sinh vật và môi trường, nghiên cứu thực nghiệm, công nghệ sản xuất thuốc và dược phẩm, giám định pháp y... Với mô động vật nói chung và các loại vi sinh vật nhỏ bé như virus, vi khuẩn, vi nấm đều có thể quan sát rõ các bào quan ty thể, bộ golgi, hạt nhiễm sắc, các tiểu thể lysosome, chất nhiễm sắc, ADN, nhân tế bào, màng tế bào, các thể liên kết tế bào, cấu trúc collagen, elastin... Ngoài ra còn phân tích các ion, các nguyên tố, các hạt nano dạng exosome trong tế bào. Trong bài viết của mình các tác giả Lesley Graham và cộng sự năm 2007, tác giả Wolff.G, Bárcena.M năm 2021 và Łukasz Mielańczyk năm 2015 cũng như nhiều tác giả khác đã nêu về các ứng dụng và quy trình xử lý mẫu với từng loại.<sup>4,7,8</sup>

Trong thực hành lâm sàng hiện nay, mô hoặc tế bào ban đầu thường không cố định trong glutaraldehyde, do thiếu sự sẵn có tại chỗ hoặc thiếu tầm nhìn xa của người nghiên cứu. Tệ hơn nữa là khi tất cả các mô đã được cố định trong formalin và nhúng trong paraffin, trước khi người ta nhận ra sự cần thiết phải nghiên cứu SCT. Tuy nhiên, nhiều nghiên cứu đã chỉ ra rằng, tất cả cấu trúc không bị mất khi mô được cố định đầu tiên trong formalin, và mẫu mô này cũng có thể dùng để phân tích TEM có giá trị. Bởi vì tốc độ cố định là những yếu tố quan trọng nhất.

Trên thực tế, formalin thâm nhập và cố định mô nhanh hơn glutaraldehyde. Điều này giải thích tại sao khi cố định các mẫu trong glutaraldehyde, các mảnh mô nhỏ (ví dụ: dày

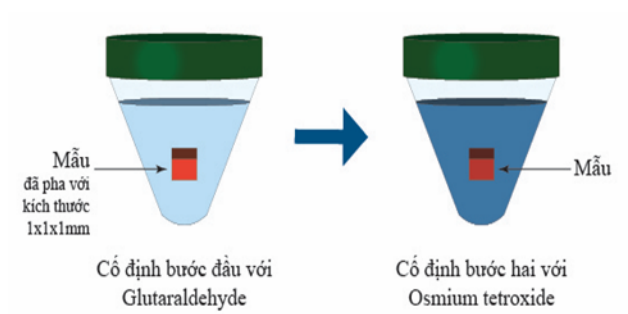


### Cố định (fixation)

Đây là bước chuẩn bị mẫu đầu tiên, mục đích là để bảo toàn mẫu sinh học, duy trì trạng thái tự nhiên của nó và để ổn định các phân tử cũng như tránh sự tổn thương mẫu ở các quy trình phức tạp phía sau như khử nước, xâm nhập, đổ nhựa... Cố định BMS có phương pháp hoá học và vật lý.

Một số chất cố định hoá học được sử dụng cho TEM như: Glutaraldehyde, Paraformaldehyde, Osmium tetroxide, dung dịch Uranyl acetate và Tannic acid... Tùy cấu trúc loại mẫu mà những chất này được dùng lần lượt hoặc kết hợp. Glutaraldehyde là một dialdehyde giúp bảo tồn SCT rất tốt nhưng xâm nhập chậm hơn các monoaldehyde như paraformaldehyde. Vì vậy, glutaraldehyde sử dụng đơn độc cho các mẫu nhỏ, còn đối với các mẫu có kích thước lớn hơn thì có thể sử dụng hỗn hợp hai aldehyde.<sup>4</sup> Thông thường, trong điều kiện tiêu chuẩn, cố định hóa học bằng phương pháp ngâm mẫu trong dung dịch cố định glutaraldehyde.

Quy trình cố định hóa học phổ biến nhất áp dụng cho chuẩn bị mẫu BMS cho TEM thông thường là cố định hai bước với glutaraldehyde (GA) và osmium tetroxide ( $\text{OsO}_4$ ). Các aldehyde bảo tồn phần lớn protein bằng cách tạo liên kết ngang với nhau, nhưng lại hạn chế với lipid. Vì vậy, cố định bước đầu bằng GA để cố định protein, cố định bước hai được thực hiện với  $\text{OsO}_4$  là chất phản ứng chủ yếu với lipid không bão hòa bằng cách tạo thành các hợp chất bổ sung với chuỗi axit béo và phản ứng với tryptophan và histidine trong protein do đó tạo liên kết chéo các chuỗi polypeptide với nhau.<sup>2</sup> Osmium cũng đồng thời tạo mật độ điện tử cho màng và các cấu trúc của tế bào mà nó liên kết, giúp tăng độ tương phản khi tiến hành phân tích hình ảnh. Sử dụng 2 - 3% glutaraldehyde với dung dịch đệm, sau đó là  $\text{OsO}_4$  1% ở nhiệt độ phòng thí nghiệm trong ít nhất từ 1 - 3 giờ cho BMS là phù hợp và phổ biến nhất hiện nay. Lưu ý các bước cố định thường được thực hiện trong tủ hút, đặc biệt là khi sử dụng  $\text{OsO}_4$  vì nó cực kỳ dễ bay hơi và độc hại.



**Hình 4. Các bước cố định mẫu hóa học bằng các chất cố định**

Tốc độ thâm nhập của cả hai chất cố định này vào mô đều chậm, nên để đảm bảo cố định được hết các vùng, mẫu cần được pha thành các mảnh nhỏ (dưới  $1\text{mm}^3$ ) và sử dụng đệm có pH tương đương với dịch nội bào (7,2 - 7,4), các dung dịch đệm được sử dụng phổ biến hiện nay như phosphate, cacodylate... Tất cả các bước cố định nên được thực hiện trên đá lạnh và với các thuốc thử mới pha để giảm thiểu

những tương tác giữa các thành tố, quá trình tự phân rã mô, thay đổi cấu trúc và bài xuất protein gây ra bởi  $\text{OsO}_4$ .<sup>3</sup>

Cố định vật lý thường là phương pháp đông lạnh. Nó có ưu điểm vượt trội hơn cố định hóa học bởi khả năng cố định chỉ tính bằng mili giây, bất động các đại phân tử gần như ngay lập tức. Điều này hỗ trợ lớn cho những nghiên cứu liên quan đến động học tế bào khi hoạt tính



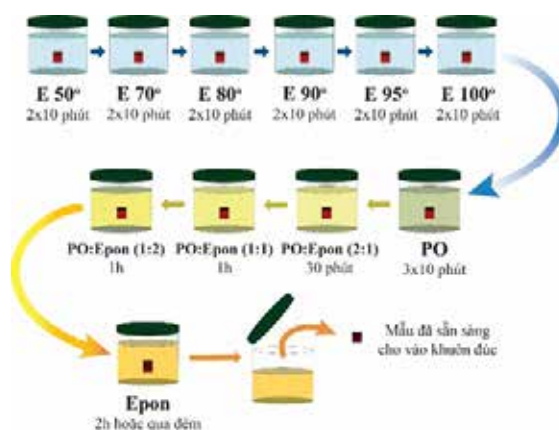
của men và tính kháng nguyên ít bị thay đổi, protein bị thoái hóa không đáng kể, giữ lại được những chất đậm đặc điện tử trong của lưới nội bào không hạt và bộ máy golgi; những hình ảnh giả sinh ra do cố định lạnh cũng dễ dàng hiểu hơn vì chỉ liên quan đến những quá trình vật lý.<sup>5</sup> Hơn nữa, biện pháp này hạn chế tối thiểu các thay đổi cấu trúc liên quan đến thẩm thấu xảy khi cố định hóa học.<sup>3</sup> Các kỹ thuật cố định đông lạnh gồm: Đông lạnh nhúng (plunge freezing) với những mẫu nhỏ như các tế bào hoặc các bào quan (độ sâu vô định hình 1 - 2 $\mu$ m); Đông lạnh áp suất cao (High pressure freezing -HPF) với những mẫu lớn hơn (độ sâu vô định hình tới 500 $\mu$ m); Đông lạnh bằng dòng khí propane (độ sâu vô định hình tới 40 $\mu$ m); đông lạnh đột ngột (10 - 15 $\mu$ m độ sâu vô định hình) và làm lạnh thay thế (tới 200 $\mu$ m độ sâu vô định hình).<sup>3</sup>

#### **Khử nước (Dehydration) và xâm nhập dung môi chuyển tiếp (Infiltration)**

Sau cố định hai bước, mẫu cần được khử nước để ngăn ngừa sự phá vỡ các thành phần cấu tạo dưới tác dụng của môi trường chân không. Mục tiêu của bước khử nước là thay thế tất cả nước tự do trong mẫu bằng chất lỏng có thể hoà lẫn cả với nước và với chất đúc. Các dung môi như cồn etylic, cồn metyl, cồn isopropyl, axeton hoặc monome của môi trường đúc nhựa hòa tan trong nước thường được sử dụng để khử nước mẫu. Cồn etylic còn gọi là cồn ethanol, là chất khử nước được sử dụng rộng rãi nhất vì nó không làm cứng mô và làm cho mô quá giòn để cắt siêu mỏng tiếp theo. Các tác nhân khác có thể được sử dụng tùy thuộc vào bản chất của vật liệu đúc đang được sử dụng. Ví dụ, axeton được sử dụng khi đúc mẫu bằng nhựa polyester Vestopal. Các hợp chất trơ như ethylene và propylene glycol cũng có thể được sử dụng làm chất khử nước hiệu quả vì chúng vừa phục vụ để thay thế nước mô vừa ổn định hệ thống đại phân tử của tế bào.

Thông thường, chất khử nước là ethanol (E) hoặc acetone, và dung môi chuyển tiếp là propylen oxide (PO-1,2-epoxypropane). Nồng độ chất khử nước cần tăng dần từ 50° đến 70° đến, 80°, 90°, 95° và cuối cùng là 100° với thời gian khoảng 10 - 15 phút mỗi lần, trong 2 lần là phù hợp.<sup>3</sup> Mục đích của việc tăng dần nồng độ vì dung môi là chất ít phân cực sẽ thay thế dần các liên kết trong phân tử nước, tránh hiện tượng mất nước đột ngột gây biến dạng mẫu. Quá trình này đủ khả năng để loại bỏ nước khỏi tế bào và sau đó thuận lợi phục vụ cho khâu đổ nhựa.<sup>5</sup> Khử nước thực hiện bằng phương pháp đông lạnh thay thế (Freeze-substitution (FS)) được áp dụng cho mẫu cố định đông lạnh.

Sau khi khử nước, cần xâm nhập dung môi chuyển tiếp để khử cồn và để mẫu sẵn sàng cho bước đổ nhựa (resin embedding). Dung môi chuyển tiếp được sử dụng thường là PO vì đặc tính hoà lẫn được cả với cồn và nhựa epoxy không ảnh hưởng đến mẫu. Các bước thực hiện có trong **Hình 5**.



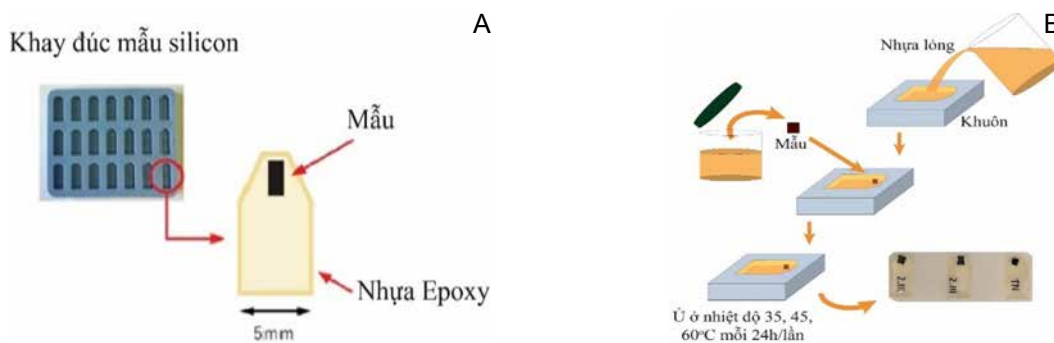
**Hình 5. Quy trình khử nước và xâm nhập dung môi chuyển tiếp**

#### **Đúc mẫu (Embedding & Polymerization)**

Hầu hết mẫu mô y sinh học đều phải được cắt thành các lát cắt đủ mỏng để chùm điện tử xuyên qua. Muốn vậy mẫu cần phải được bao bọc trong chất có đủ độ cứng trong quá

trình cắt mẫu bằng máy cắt siêu mỏng. Quá trình này gọi là đúc mẫu. Trước đây, sáp parafin được sử dụng làm phương tiện đúc nhưng được phát hiện là quá mềm để cho phép cắt các phần mỏng hơn khoảng  $1\mu\text{m}$ . Tính chất của môi trường đúc mẫu lý tưởng gồm: Hòa tan trong ethanol (hoặc axeton) trước khi trùng hợp; không biến đổi mẫu vật về mặt hóa học; không làm gián đoạn vật lý hoặc biến dạng mẫu vật lý; khả năng cứng đồng đều; tạo ra một khối đủ cứng nhưng đủ dẻo để cắt các phần siêu mỏng và phải ổn định dưới bức xạ điện tử. Chất đúc đầu tiên được tìm thấy phù hợp với kính hiển vi điện tử là poly-butyl methacrylate, tuy

nhưng hiện nay phần lớn sử dụng từ các đơn phân epoxy như nhựa Spurr's, nhựa Araldite hoặc Epon 812 được lựa chọn dùng phổ biến vì có độ nhớt thấp, dễ thấm vào cấu trúc tế bào, phù hợp để đúc các mẫu y sinh học với tỷ lệ hai chất làm cứng trong hỗn hợp này phù hợp độ cứng của mô và khối nhựa, đảm bảo với quá trình cắt mẫu và có thể bảo quản được lâu dài, đồng thời. Sau khi đổ nhựa lỏng xong, cần trùng hợp khối mẫu (polymerization) dưới sự gia nhiệt vừa phải khoảng  $60 - 70^\circ\text{C}$  thời gian khoảng 2 - 4 ngày để làm cứng khối nhựa (**Hình 6B**). Đến đây mới kết thúc quá trình đúc mẫu và sẵn sàng cắt mẫu làm tiêu bản.<sup>4</sup>



**Hình 6. Quy trình đúc mẫu. A – Khuôn đúc mẫu epoxy; B – Các bước đổ nhựa**

### Cắt mẫu (Sectioning)

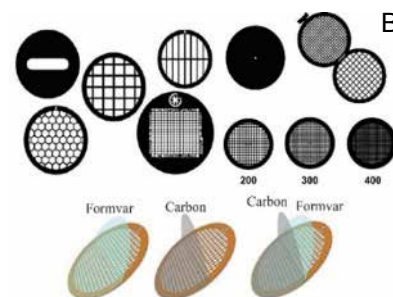
Cắt mẫu cần phải đảm bảo cắt đúng, trúng vùng nghiên cứu. Do đó, cắt mẫu chia 2 giai đoạn cắt gọt thô và siêu cắt. Cắt gọt thô nhằm mục đích loại bỏ bớt các phần mẫu không cần và để định hướng cắt siêu mỏng. Tiêu bản bán mỏng bằng nhuộm Xanh Toludin hoặc Xanh Methylen cũng có thể được dùng để nghiên cứu vi thể soi trên kính Hiển vi quang học. Khối mẫu thường được gắn trong mâm cặp và đầu tròn của khối đúc được cắt tự do bằng lưỡi dao thủy tinh thành một kim tự tháp cắt ngắn bốn cạnh có góc khoảng  $45^\circ$  và mặt vuông khoảng  $0,5\text{mm}$ . Diện tích của mặt khối càng nhỏ thì càng dễ cắt các phần siêu mỏng.

Sau khi xác định vùng nghiên cứu trên tiêu bản cắt bán mỏng định hướng xong, tiến

hành cắt siêu mỏng làm tiêu bản SCT bằng máy cắt siêu mỏng (ultramicrotome) với lưỡi dao kim cương hoặc dao thủy tinh (**Hình 7A**). Dao thủy tinh đã được chứng minh là phổ biến nhất trong số các lưỡi cắt vì chúng không đắt, tương đối dễ chế tạo và thuận tiện khi sử dụng. Một con dao thủy tinh thường có hình tam giác và làm từ một mảnh thủy tinh vuông dọc theo một đường chéo trên bề mặt của nó. Lưỡi cắt phải thẳng và đều và mặt trước (đối diện với mẫu) rất phẳng và nhẵn. Cạnh được đánh bóng, gáy của dao kim cương cứng hơn và chống mài mòn hơn thủy tinh, nhưng nó không phải là lưỡi cắt tốt hơn. Ngoài ra, dao kim cương phải được làm sạch trước mỗi lần sử dụng. Góc vát của dao thông thường là khoảng  $45^\circ$  và góc khe hở thường được điều

chỉnh thành 2 - 5°. Cánh tay của máy cắt siêu mỏng giữ chắc khối mẫu bên trong sẽ thực hiện các cử động lên xuống đều đặn với lập trình chính xác tốc độ cắt và độ dày mỗi lát cắt. Hầu hết, các máy siêu cắt mới đều có cơ chế cài đặt tự động. Độ dày thông thường của các

lát cắt mẫu sinh học trong khoảng 60 - 90nm. Sau khi cắt, các lát cắt sẽ trôi vào và nổi trên một máng chứa nước ngay cạnh. Tiến hành vớt mẫu thành từng cụm từ 2 đến 4 lát lên lưới đỡ mẫu bằng cây chải lông mi. Đặt các lát cắt nằm ở trung tâm lưới.



**Hình 7. Máy cắt siêu mỏng, lưới gắn dao kim cương (A) và các loại lưới đỡ mẫu (B)**

Các tấm lưới được làm từ kim loại không nhiễm từ tính (đồng, vàng, bạch kim, niken, rhodium) nhằm không gây ảnh hưởng đến hệ thống dựng hình của kính, chùm điện tử sẽ đi qua các mắt lưới này để đến bộ phận tạo ảnh. Có nhiều cách bố trí mắt lưới khác nhau, tùy theo mục đích nghiên cứu cụ thể mà nhà nghiên cứu lựa chọn loại lưới cho phù hợp. Ngoài ra, để nâng đỡ mẫu trên các mắt lưới tốt hơn, các tấm lưới thường được bọc thêm một màng nhựa mỏng (thường là formvar), và có thể được củng cố thêm bằng lớp phủ carbon (**Hình 7B**).<sup>2</sup>

#### **Nhuộm tiêu bản (Staining & contrasting)**

Đây là bước cuối cùng để làm tiêu bản SCT. Lựa chọn thuốc nhuộm là rất quan trọng. Do các mẫu sinh học tự thân hầu hết được cấu thành bởi các phần tử nhẹ (C, H, O, N), nên để tăng cường sự tương phản chúng được gắn với các nguyên tử kim loại nặng. Thuốc nhuộm đóng vai trò hấp thu các electron của chùm tia hoặc phân tán một phần chùm electron. Hai kỹ thuật tạo tương phản chính là tạo tương phản dương tính và tạo tương phản âm tính. Các kim loại nặng được sử dụng chủ yếu là uranium (uranyl acetate (UA)), chì (lead citrate) và tungsten

(Wolfram) hoặc vàng trong gắn nhãn miễn dịch vàng.<sup>3</sup> Thông thường hiện nay, sử dụng phương pháp nhuộm tương phản kép với UA và chì citrate là kỹ thuật tiêu chuẩn cho TEM.

Ưu điểm của UA là tạo ra mật độ electron và độ tương phản rất tốt cũng như tạo ra hạt mịn cho hình ảnh do trọng lượng nguyên tử là 238 urani. Các ion uranyl sẽ liên kết với protein, lipid, các nhóm carboxyl axit sialic như glycoprotein và ganglioside và với các nhóm axit phosphate của DNA và RNA. Ganglioside là glycolipid và tập trung trên bề mặt tế bào. Glycoprotein có nhiều trong tất cả các màng và một phần của glycocalyx. Do đó, UA làm tăng hiển thị màng, axit nucleic và axit nucleic và ribosome. Nhược điểm của UA là nhạy cảm với ánh sáng, đặc biệt là tia cực tím và bị kết tủa nếu tiếp xúc. Ngoài ra, UA vừa là chất phóng xạ, vừa độc hại, nếu nuốt phải, hít phải dưới dạng bụi hoặc tiếp xúc với da bị hở thì rất độc hại. Do đó, cần có biện pháp an toàn bảo hộ cho người thực hiện và các UA không sử dụng hết cũng cần được bảo quản an toàn đúng quy cách, dung dịch UA nên để ở lọ thủy tinh bọc kín tránh ánh sáng và để trong tủ lạnh khoảng 4°C, thời gian từ vài tháng đến 1 năm.



Ngoài ra, một giải pháp giúp tăng tạo độ tương phản là kỹ thuật tạo bóng đổ (Shadow casting technique), đây là phương pháp được áp dụng để nghiên cứu các virus và các đại phân tử, đặc biệt khi kích thước của chúng rất nhỏ và ở dạng sợi. Phương pháp này được thực hiện với máy bốc bay kim loại trong chân không. Quá trình này tạo một lớp phủ kim loại ở một bên của mẫu trong khi tạo hiệu ứng bóng đổ ở phía sau.<sup>5</sup>

### **Tạo độ tương phản dương tính**

Các muối kim loại nặng được sử dụng trong tạo độ tương phản dương tính gắn với các đại phân tử ở trong mẫu và tăng khả năng phân tán các hạt electron của chúng, từ đó tăng độ tương phản trên toàn bộ các mẫu vật. Hóa chất thường dùng là Uranyl acetate (UA) và Chì citrate. UA phản ứng với phospho và nhóm amino của acid nucleic và protein. Chì citrate gắn với phân tử mang điện tích âm như các nhóm Hydroxyl và phân tử đã nhuộm với Osmium tetroxide. Kỹ thuật này thực hiện với hầu hết các mẫu mô y sinh học, mẫu mô người, động vật.

### **Tạo độ tương phản âm tính**

Tạo độ tương phản âm tính là một quy trình nhanh gọn, thường được sử dụng khi cần đưa ra các kết luận nhanh chóng. Các chất tạo tương phản bao quanh cấu trúc sinh học, tăng cường hình dạng và đường viền của mẫu. Kỹ thuật này được sử dụng đối với các vật thể có kích thước nhỏ hơn 100nm (virus, vi khuẩn, hạt esosome...), có thể cho hình ảnh trực tiếp mà không cần cắt. Các muối của kim loại nặng thường sử dụng gồm: uranyl acetate, phosphotungstic acid (PTA), ammonium molybdate... Có hai cách nhuộm âm tính là: Nhỏ giọt và thả nổi (cả hai cách mẫu cần được bất hoạt).<sup>3</sup>

### **Nhuộm gắn nhãn miễn dịch**

Nguyên lý của nó là đánh dấu vị trí của kháng nguyên trong mẫu bằng kháng thể đặc

hiệu. Các kháng thể hoặc liên hợp trực tiếp với phân tử đánh dấu, hoặc gián tiếp bằng việc liên kết với kháng thể thứ cấp có gắn chất đánh dấu. Kính TEM cho phép chúng ta phân biệt các bào quan dưới tế bào, và do đó định vị SCT của vị trí kháng nguyên. Phương pháp được ưa chuộng nhất để chuẩn bị sinh mẫu cho gắn nhãn miễn dịch là kỹ thuật cắt đông lạnh của Tokuyasu, bởi vì nó là kỹ thuật gắn nhãn miễn dịch sau đúc duy nhất không đòi hỏi khử nước trong mẫu bằng dung môi phân cực trước khi sử dụng các marker liên quan.<sup>4</sup> transmission electron microscopy (TEM Gắn nhãn miễn dịch tối ưu là đạt được các tiêu chí gồm: bảo tồn tối đa kháng nguyên; có độ đặc hiệu gắn kết kháng nguyên kháng thể cao; sản phẩm liên hợp cuối cùng sẽ hiển thị rõ ràng trên kính TEM. Lưới chứa mẫu được đặt trên một giọt kháng thể sơ cấp, thường trong dung dịch đệm có chứa albumin huyết thanh bò, gelatin hoặc sữa, và rửa sạch, sau đó tiếp xúc với kháng thể thứ cấp liên hợp với các hạt vàng keo trong phạm vi đường kính 5 đến 20nm.

Một số phòng thí nghiệm có thể tăng cường thêm độ tương phản electron ở bước sau khi cố định osmic và trước khi mô được nhúng nhựa. Một vấn đề khác nữa là trong quá trình nhuộm tương phản cần thêm một ít hạt NaOH 1M để hấp thụ CO<sub>2</sub> sinh ra, tránh CO<sub>2</sub> kết tủa với chì.

### **Soi mẫu và hiển thị hình ảnh**

Sau các quy trình chuẩn bị mẫu, mẫu đã sẵn sàng cho soi và chụp hình bởi TEM. Các kính TEM hiện đại có giao diện máy tính chi tiết và dễ điều khiển. Quan sát mẫu bắt đầu từ độ phóng đại thấp (x100 - x1000) để định khu lát cắt trên lưới và chọn ra vùng quan tâm để quan sát ở độ phóng đại cao hơn.<sup>2</sup> Hình ảnh trắng đen thể hiện mức độ cản điện tử khác nhau: các cấu trúc có vật chất ít, khối lượng riêng thấp (không bào) có màu trắng hơn, trong khi các cấu trúc chứa vật chất nhiều (nhân, màng

tế bào, melanin...) cho màu đen. Quá trình lựa chọn hình ảnh, điều chỉnh độ sắc nét và độ mịn của hình ảnh cần sự nhẫn nại, kiên trì và nhạy bén. Đồng thời cũng tránh các ảnh hưởng của chùm tia và áp lực chân không gây phá huỷ lát

cắt trên lưới. Có thể sử dụng máy ảnh CCD để chụp ảnh kỹ thuật số. Khi ghi hình và lưu hình ảnh cần cài đặt các thông số máy, thông số ảnh, thông tin ảnh, mẫu soi để khi xuất ảnh sẽ cho nhiều thông tin nhất có thể.

#### QUY TRÌNH CHUẨN BỊ TIÊU BẢN MÔ Y SINH HỌC

1. Pha mẫu kích thước 1mm<sup>3</sup>
2. Cố định ban đầu với glutaraldehyde 2-3% trong đệm cacodylate 0,1M, pH 7,3 x 2-3h
3. Rửa mẫu trong đệm cacodylate 0,1M, pH 7,3 x 10 phút x 2 lần;
4. Cố định sau trong OsO<sub>4</sub> 1% trong đệm cacodylate 0,1, pH 7,3 trong 2h;
5. Rửa mẫu trong đệm cacodylate 0,1M, pH 7,3;
6. Khử nước mẫu bằng cồn ethanol hoặc acetone nồng độ tăng dần 50% - 100% x 15 phút x 2 lần;
7. Khử cồn bằng propylen oxide x 10 phút x 2 lần;
8. Đúc mẫu trong Epon 812; ủ trong tủ ẩm lần lượt: 35°C (24h), 45°C (24h), 60°C (24h);
9. Cắt gọt thô, cắt bán mỏng dày 0,5 - 2μm, làm tiêu bản nhuộm Xanh Toluidin 1% để định hướng;
10. Cắt siêu mỏng dày 60-80nm x 2-3 lát
11. Làm tiêu bản trên lưới đồng 200 mắt lưới;
12. Nhuộm tiêu bản với uranyl acetat 1%, chì citrate, NaOH 1N;
13. Soi tiêu bản trên kính TEM.

#### QUY TRÌNH CHUẨN BỊ TIÊU BẢN MÔ ĐỨC PARAFFIN

1. Chia khối paraffin vùng nghiên cứu; kích thước mẫu 1mm<sup>3</sup>.
2. Rửa paraffin: Đặt khối lên tấm giấy lọc, để trong tủ ẩm 60-70°C;
3. Tẩy paraffin bằng xylen lần lượt: 100% 12 -24h; thay tiếp 2 lần x 30 phút và 2 lần x 15 phút;
4. Bù nước mẫu bằng hỗn hợp xylen - ethanol 100% (1:1) x 5 phút; sau đó ethanol 100% x 5 phút; ethanol 95%, 80%, 70% x 10 phút mỗi loại.
5. Rửa trong đệm Cacodylat 0,1M, pH 7,3 x 10 phút x 2 lần;
6. Cố định trong hỗn hợp OsO<sub>4</sub> 0,25% và 97,5% cồn ethanol trong 1h; hoặc OsO<sub>4</sub> 1% x 1h ở 4°C
7. Rửa mẫu trong đệm cacodylate 0,1M, pH 7,3 x 10 phút x 2 lần;
8. Khử nước mẫu bằng cồn ethanol nồng độ tăng dần 70%, 80%, 96% và 100% x 15 phút x 2 lần;
9. Khử cồn bằng propylen oxide x 10 phút x 2 lần;
10. Đúc mẫu trong Epon 812 qua đêm; sau đó ủ trong tủ ẩm lần lượt: 35°C (24h), 45°C (24h), 60°C (24h);
11. Cắt gọt thô, cắt bán mỏng dày 0,5 - 2μm, làm tiêu bản nhuộm Xanh Toluidin 1% để định hướng;
12. Cắt siêu mỏng dày 60-80nm x 2-3 lát;
13. Làm tiêu bản trên lưới đồng 200 mắt lưới;
14. Nhuộm tiêu bản với uranyl acetat 1%, chì citrate, NaOH 1N;
15. Soi tiêu bản trên kính TEM.

Hình 8. Quy trình làm tiêu bản SCT trên kính TEM tại Viện 69

(Hình A – Quy trình với mô tươi; Hình B – Quy trình với mô cố định formalin và đúc paraffin,)



Hình 9. Kính TEM – Jeol 1400 (Japan) tại Khoa Hình thái, Viện 69, BTL Lãng

### III. KẾT LUẬN

Kính hiển vi điện tử truyền qua có vai trò to lớn trong việc cung cấp các hình ảnh rõ nét về SCT ở cấp độ nanomet và phân tử. Trong lĩnh vực y sinh học, kính hiển vi điện tử truyền qua là thiết bị hiệu quả nhất trong việc quan sát các cấu trúc siêu nhỏ bên trong mô tế bào của tất cả các bộ phận cơ thể người, động vật, vi sinh vật... Tuy nhiên, do chi phí đầu tư và duy trì, bảo trì thiết bị rất lớn, kèm theo cần lượng vật tư, hoá chất chuyên dụng và cần lực lượng chuyên môn được đào tạo để thực hiện nên kỹ thuật soi mẫu siêu cấu trúc trên TEM ít được triển khai và không sẵn có ở nhiều nơi. Ngoài

ra việc chuẩn bị mẫu không tốt cũng có thể gây sai lệch kết quả hoặc hỏng mẫu như cố định không đủ, không tốt, không khử hết nước trong mô... Vì thế, việc tuân thủ nghiêm ngặt quy trình chuẩn bị mẫu gồm: Cố định mẫu, khử nước, xâm nhập, đúc mẫu trong nhựa, cắt siêu mỏng và nhuộm tiêu bản vẫn là những yêu cầu chính để đạt được kết quả có chất lượng cao. Vậy nên, việc tìm hiểu và nắm chắc các kiến thức cơ sở ban đầu với nền tảng của chuẩn bị mẫu và nguyên lý vận hành kính hiển vi điện tử là rất cần thiết đối với mỗi nhà nghiên cứu, giúp họ có sự hiểu biết cơ bản, bao quát từ đó biết cách chuẩn bị và triển khai nghiên cứu tốt nhất.

### KHUYẾN NGHỊ

- Tại các cơ sở đào tạo y khoa nói chung và các trường nghiên cứu về y sinh học cần đưa các chương trình giới thiệu, bài giảng về lĩnh vực kính hiển vi điện tử và ứng dụng trong nghiên cứu khoa học, chẩn đoán lâm sàng. Có thể kết hợp với các cơ sở có thiết bị để đến quan sát và thực hành trực tiếp, sẽ có kiến thức cơ bản ngay từ đầu.

- Mỗi nhà nghiên cứu nên tìm hiểu kỹ hơn về các phương pháp nghiên cứu y khoa, trong đó có các phương pháp hình ảnh, hình thái học. Thường xuyên trao đổi với những nhà khoa học có kinh nghiệm để nắm bắt thông tin và mở rộng kiến thức nhiều hơn, phục vụ cho nghiên cứu của bản thân. Cần nên bắt đầu với mẫu đơn giản, tươi mới theo đúng quy trình đã nêu để bảo đảm chất lượng hình ảnh trên TEM.

- Cần thường xuyên tổ chức các hội nghị, hội thảo để cập nhật, cung cấp thêm nhiều thông tin các nghiên cứu về siêu cấu trúc cho mọi người.

### TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Tizro P, Choi C, Khanlou N. Sample Preparation for Transmission Electron Microscopy. In: Yong WH, ed. *Biobanking*. Vol 1897. Methods in Molecular Biology. Springer New York; 2019: 417-424. doi:10.1007/978-1-4939-8935-5\_33.
2. Winey M, Meehl JB, O'Toole ET, Giddings TH. Conventional transmission electron microscopy. Drubin DG, ed. *Mol Biol Cell*. 2014; 25(3): 319-323. doi:10.1091/mbc.e12-12-0863.
3. Dumančić E, Vojta L, Fulgosi H. Beginners guide to sample preparation techniques for transmission electron microscopy. *Period Biol*. 2023; 125(1-2): 123-131. doi:10.18054/pb.v125i1-2.25293.
4. Mielańczyk Ł, Matysiak N, Klymenko O, Wojnicz R. Transmission Electron Microscopy of Biological Samples. In: Maaz K, ed. *The Transmission Electron Microscope - Theory and Applications*. InTech; 2015. doi:10.5772/60680.
5. Kim Giao N. *Hiển vi điện tử trong khoa học sự sống*. Nhà xuất bản Đại học Quốc Gia Hà Nội; 2004.
6. Egerton RF. Choice of operating voltage for a transmission electron microscope. *Ultramicroscopy*. 2014; 145: 85-93. doi:10.1016/j.ultramic.2013.10.019.
7. Graham L, Orenstein JM. Processing tissue and cells for transmission electron microscopy in diagnostic pathology and research. *Nat Protoc*. 2007; 2(10): 2439-2450. doi:10.1038/nprot.2007.304.
8. Wolff G, Bárcena M. Multiscale Electron Microscopy for the Study of Viral Replication Organelles. *Viruses*. 2021; 13(2): 197. doi:10.3390/v13020197.

## Summary

# OVERVIEW OF ULTRASTRUCTURAL STUDIES IN BIOMEDICAL TISSUES USING TRANSMISSION ELECTRON MICROSCOPY

In biomedical research, tissue and cell morphology analysis by transmission electron microscopy is an ideal method for studying intracellular structures and other types of biological matter. It provides realistic images with nanometer resolution supporting detailed visualization and evaluation of ultrastructural changes and lesions in tissues and cells. However, to observe the image clearly and realistically, researchers must ensure that the biomedical tissue sample is well prepared through steps that require high technique and precision. In this review, we aim to provide an overview of the ultrastructural study of biomedical tissues using transmission electron microscopy, and to provide an overall understanding of the ultrastructural study of biomedical samples to young researchers.

**Keywords:** Transmission electron microscopy, ultrastructure of biological samples.