

知识介绍

激光扫描共聚焦显微技术在高分子科学研究中的应用

张滢滢, 郭 毅, 沈 烈*

(高分子合成与功能构造教育部重点实验室, 浙江大学高分子科学与工程学系, 杭州 310027)

摘要:激光扫描共聚焦显微技术作为一种深层形态结构分析的重要研究方法, 避免了繁琐的实验操作以及对样品的破坏, 可直接给出材料内部结构的三维图像, 在生物学、医学、材料科学和冶金学等研究领域都有广泛的应用。本文阐述了激光扫描共聚焦显微镜的工作原理及技术优势, 综述了激光扫描共聚焦显微技术在高分子科学研究领域的应用进展, 包括聚合物多组分体系、聚合物颗粒、聚合物膜、嵌段共聚物自组装以及药物控释表征, 以为更多科研人员提供有益参考。

关键词:激光扫描共聚焦显微镜; 高分子科学; 应用

引言

激光扫描共聚焦显微镜(Laser Scanning Confocal Microscope, LSCM)是 20 世纪 80 年代发展起来的高技术光电仪器^[1]。LSCM 最初主要应用于生物学和生命科学领域, 研究荧光标记的生物活性结构的分布。LSCM 可清晰地得到 Z 轴多层平面结构, 即光学切片, 并构建标本的三维实体结构^[2]。目前, LSCM 已成为一项十分重要的科研工具, 在生物学^[3]、医学^[4]、材料科学^[5, 6]和冶金学^[7]等研究领域中都有广泛的应用, 由于具有精度较高、制样简单、可对聚合物的三维形态进行无损快速分析等优点, 在分子科学研究领域中也逐渐得到了应用, 如用于聚合物多组分体系、聚合物颗粒、聚合物膜、嵌段共聚物自组装以及药物控释表征等。本文主要综述了 LSCM 在分子科学研究中的应用进展。

1 激光扫描共聚焦显微镜工作原理

LSCM 主要是把荧光显微镜、激光扫描和计算机图像处理等装置组合在一起。采用激光束代替普通的光源, 激光通过照明针孔后, 由分光镜反射到物镜, 并在样品上聚焦, 对标本内焦平面上的每一点进行扫描。样品所激发的荧光经过入射光路直接反向回到分光镜, 通过探测针孔时首先聚焦, 聚焦后的光被光电倍增管所采集(如图 1 所示)^[5], 并将信号输送到计算机显示图像。照明针孔与探测针孔相对于物镜焦平面是共轭的, 在这个光路中, 只有在焦平面的光才能穿过探测针孔, 焦平面以外区域射的光线在探测针孔平面是离焦的。因此, 非观察点的背景呈黑色, 反差增加, 有效地提高了图像的分辨率和清晰度。此外, 还可以沿 Z 轴上下移动, 得到不同层面连续的光切图像, 形成三维图像^[8]。

2 激光扫描共聚焦显微镜技术优势

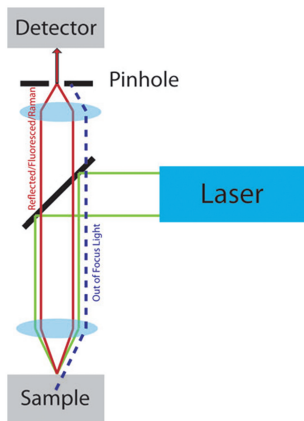
目前, 研究聚合物表面形貌最常用的仪器有扫描电镜(SEM)、透射电镜(TEM)和原子力显微镜(AFM)等。与这些表征方法相比, LSCM 具有以下优势: (1)样品制备时不需要冷冻或干燥; (2)使用不

10.14028/j.cnki.1003-3726.2022.01.010

收稿: 2020-10-14; 修回: 2021-05-08;

作者简介: 张滢滢(1990-), 女, 硕士, 主要从事公共技术平台大型仪器应用与管理工;

* 通讯联系人: 沈烈(1961-), 男, 博士, 副教授, 实验中心主任, 研究方向为高分子复合材料。E-mail: shenlie@zju.edu.cn.

图 1 激光扫描共聚焦显微镜的光路示意图^[5]Figure 1 The optical path of laser scanning confocal microscope^[5]

同放大倍率的物镜,观测范围可从亚微米至毫米;(3)在不破坏样品的前提下,可观测到样品内部结构的真实信息;(4)可通过对不同成分有选择性地荧光探针染色来区分不同的化学物种;(5)可将在不同焦平面上获得的多个二维图像重建为三维结构^[9, 10]。随着显微技术不断进步以及功能不断增强,最近开发的超分辨率显微技术^[10~12],如受激发射损耗显微技术(STED)、光激活定位显微技术(PALM)、随机光学重建显微技术(STORM)和结构光照明显微技术(SIM),能够以更高的空间分辨率(横向分辨率:小于100nm)采集图像。

3 LSCM 在 高 分 子 科 学 研 究 中 的 应 用

3.1 表征聚合物多组分体系

聚合物多组分体系是高分子材料科学的重要研究领域,体系中各组分的相容性及相态结构直接决定了材料的性能。如从三维图像观察,不同高分子组分可形成连续的及不连续的相态结构。目前,表征聚合物多组分体系的形态结构常用方法有:SEM、TEM、AFM、X 射线光电电子能谱法(XPS)等。以上部分表征方式可从分子水平上获取共混体系中各组份形态结构或相互作用的信息,但各自均存在一定的局限性,如对样品的要求较为苛刻、制样比较复杂、只能给出表面结构的信息或宏观平均结构图象^[13]。如要分析材料的层次形态结构及其分布,需要破坏样品。因此,LSCM 作为一种无损的观察多组分聚合物体系多层形态结构的新方法,有许多独特的优越性,其检测深度可达 100 μm ,制样简单、检测快速、图象直观,具有良好的应用前景^[14~16]。

1993 年,Boer 等^[14]首次报道了 LSCM 在聚合物共混物形态测定中的应用,研究了苯乙烯(S)-乙烯/丁烯(EB)嵌段共聚热塑弹性体与聚醚酯(EM400)不同组成的共混物的形态。其中,嵌段是由 70% 的 S-EB-S 三嵌段共聚物和 30% 的 S-EB 两嵌段共聚物组成,聚醚酯是由 40% 聚对苯二甲酸二丁酯作为硬段和 60% 对苯二甲酸四甲基醚酯作为软段组成。如图 2 所示,使用 LSCM 获取共混物从表面至 50 μm 深度不同层面的显微照片,利用软件叠加重构后可得三维图像。结果表明,当共混物挤出后压制成片,含 50% S-EB-S 的共混物呈现双连续相,而含 80% S-EB-S 的共混物则分散在 EM400 的连续相中。LSCM 所得结果与用 SEM 或 TEM 观测其断面所得结果一致,避免了繁琐的实验操作以及对样品的破坏,直接给出材料内部结构的三维图像。

3.2 表征聚合物颗粒

通过 LSCM 对聚合物颗粒进行光学分层扫描,可观察到颗粒从表面至中心各层平面的形貌。其最大的优点在于简化了制样过程,无需对颗粒进行包埋、切片,在几分钟内便可看出聚合物颗粒的形貌,是

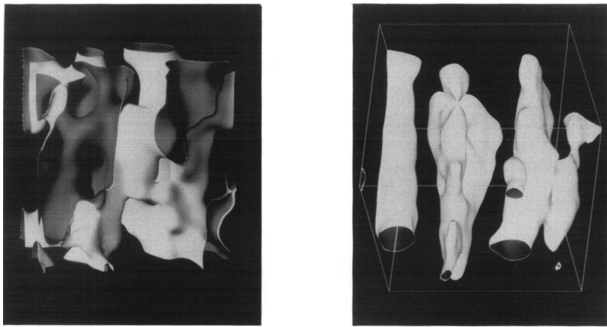


图 2 EM400/S-EB-S 共混物比例分别为 50/50(左)和 20/80(右)时两种高分子界面的三维重组图像^[14]
Figure 2 Three-dimensional reconstruction of the interface between the EM400 and the S-EB-S polymer in the 50/50 (left) and 20/80 (right) pressed blend^[14]

一种简易且快捷的表征方法^[17~20]。

Jang 等^[19]利用聚环氧丙烷改性的聚苯乙烯纳米粒子作为载体,用荧光染料二嵌联苯单酰亚胺进行标记,使之均匀地分布在载体上,最后将活性组分负载在标记的载体上制成催化剂。用其催化乙烯聚合,控制较短的聚合时间,可制得低转化率的聚合产物。用 LSCM 对所得的聚乙烯(PE)颗粒进行形态表征,如图 3 所示,荧光染料标记的催化剂呈现出明亮的红色。因此,可清晰地观察到催化剂碎片在聚合物颗粒中的分布情况,从而对催化剂在烯烃聚合过程中的破碎行为进行探讨。该技术的优点是极大地简化了样品制备过程,仅通过荧光染料标记载体就可以在单个聚乙烯颗粒内获得催化剂分布的三维图像^[19]。

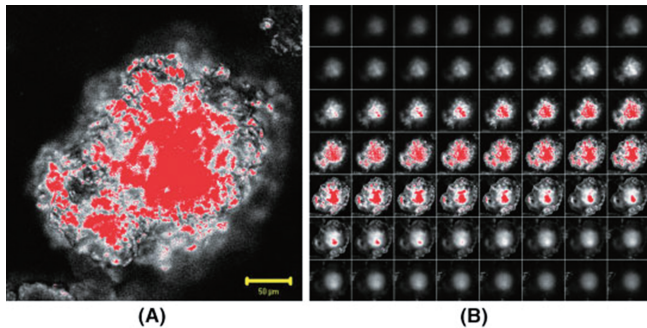


图 3 利用染料标记过的催化剂催化所得单个 PE 颗粒(聚合时间 5min)的 LSCM 图像
(A)PE 的中间切片图像和(B)PE 从顶部到底部的 56 张光学切片图像^[19]

Figure 3 LSCM images of a single PE particle (5min polymerization) obtained by the catalyst supported on the dye-stained microsized PS

(A) Middle slice image of PE and (B) 56 slices of PE by optical sectioning from top to bottom^[19]

3.3 表征聚合物膜

LSCM 可用来观察聚合物样品表面亚微米程度的三维形态和像貌,也可以测量多种微小的尺寸,如体积、面积、晶粒、膜厚、深度、长宽、线粗糙度、面粗糙度等^[21~25]。

Cznotka 等^[25]合成了 8 种覆盖不同流体渗透组件的聚偏二氟乙烯-六氟丙烯(PVDF-HFP)共聚物薄膜,利用 LSCM 对样品表面扫描来创建样品表面的 3D 图像。如图 4 所示,根据所应用的颜色代码,红色和蓝色分别表示膜表面上的高和低结构。通过软件测量,可得到 8 种含有不同组分聚合物膜的表面粗糙度。即使在较大的区域,也可以在几秒钟或几分钟内精准地获得表面粗糙度。此外,表面非常柔软或者是粘性的材料均是可测量的。

3.4 表征嵌段共聚物自组装

嵌段共聚物可通过自组装形成胶束^[26~28]、囊泡^[29]和纤维^[30~33]等形貌。LSCM 在观测自组装形貌

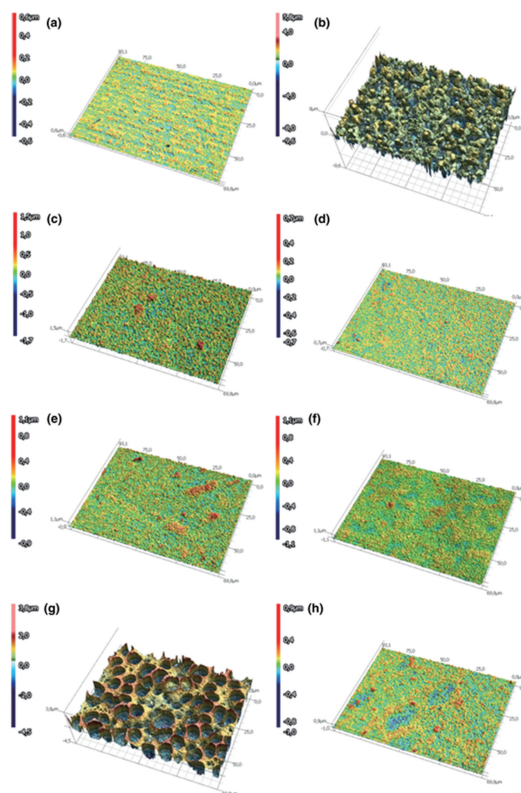


图 4 八种基于 PVDF-HFP 的半互穿网络结构膜的激光共聚焦扫描 3D 图像^[25]

Figure 4 3D LSCM images of the eight PVDF-HFP-based semi-IPN membranes^[25]

时,样品不需要冷冻或者干燥,不会改变样品的自组装结构。此外,可通过选择合适的荧光染料标记来区分不同化学物质^[9]。

2015 年,Manners 等^[26]发现具有不同亲水及疏水结构的三嵌段胶束,在不同溶液中进行活性自组装时可表现出不同的自组装形态。以聚二甲基硅氧烷为疏水基(H),聚(2-乙烯基吡啶)作为有亲水基(P),将可结晶的聚二茂铁基二甲基硅烷核心形成的嵌段作为前体,调节合适的嵌段长度,可以得到 P-H-P 以及 H-P-H 类型的三嵌段柱状胶束。通过选择非极性疏水己烷(或癸烷)和极性亲水异丙醇作为溶剂,胶束可自组装为不同的形态。对此胶束进行荧光染料标记后,可利用 LSCM 直接观察其在溶液中的状态。其结果表明,在溶液中胶束仍然保持三维以及一维的超晶格状态(见图 5)。

Deng 等^[29]通过两种 *N*-硫代羧基内酰胺(MeSPG-NTA 和 Sar-NTA)的顺序分段投料聚合合成两亲性嵌段共聚物。通过纳米沉淀法、双乳液法等自组装方法,PMESP_G-*b*-PSar 能分别形成纳米和微米尺度的聚类肽囊泡。在 LSCM 的表征下,由双乳液法获得的微米囊泡在 H₂O₂ 刺激下随时间逐渐崩解的过程被完整记录下来。将一种疏水的光敏剂四苯基卟啉(TPP)引入到 PMESP_G-*b*-PSar 囊泡体系中,TPP 可通过疏水相互作用附着在囊泡膜上,在光刺激下会引起囊泡崩解(见图 6)。

Meijer 等^[32]基于染料对聚合物的自发物理吸附,直接使用 LSCM 观察到超分子嵌段共聚物。由三芳基胺三酰胺单体 S-1 或 S-2 制成的两种预组装均聚物的混合物,可形成热力学稳定的超分子嵌段共聚物。这两种不同的均聚物在混合前通过不同荧光探针的物理吸附进行了改性,利用一种超高分辨率模式,清楚地观察到了共聚物的双色连续纤维嵌段(见图 7)。

3.5 在药物控释中的作用

激光共聚焦显微镜可在不损伤细胞的前提下,对活组织、活细胞进行观察和测量,因此可用 LSCM 来表征药物在释放本体中的空间分布情况^[34~36]。Zhai 等^[36]合成了侧链中含有二硫键并接有胆固醇基

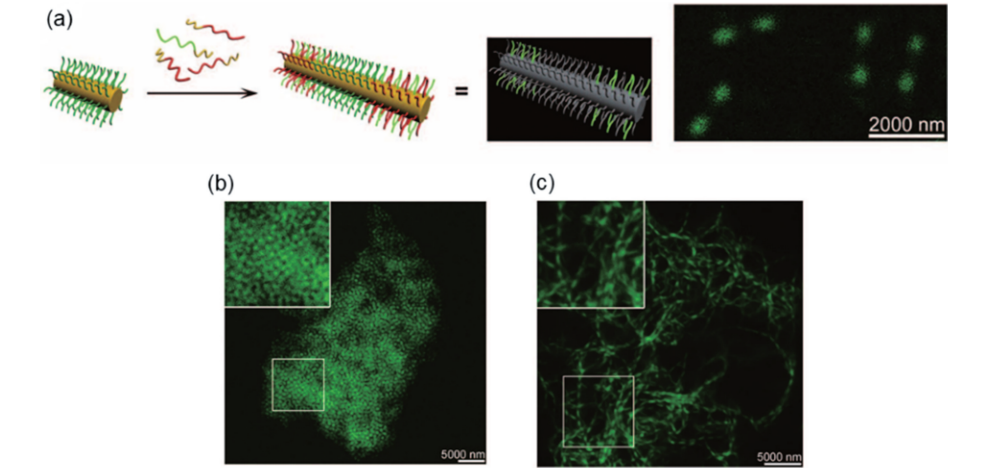


图 5 (a)H-P-H 型三嵌段胶束行成示意图以及 LSCM 图像; (b)三维超晶格 LSCM 图像; (c)一维超晶格 LSCM 图像^[26]
Figure 5 (a) Preparation of H-P-H triblock comicelles and LSCM image; (b) LSCM images of a 3D superlattice; (c) LSCM images of a 1D superlattice^[26]

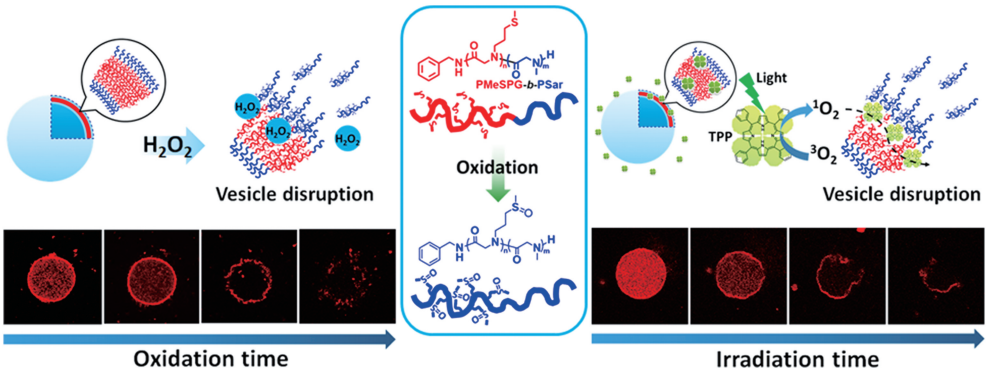


图 6 PMeSPG-*b*-PSar 的自组装以及囊泡在共聚焦显微镜激光照射下随时间的崩解过程^[29]
Figure 6 Self-assembly of PMeSPG-*b*-PSar block copolymers and disruption of vesicles under the illumination of the confocal laser of LSCM^[29]

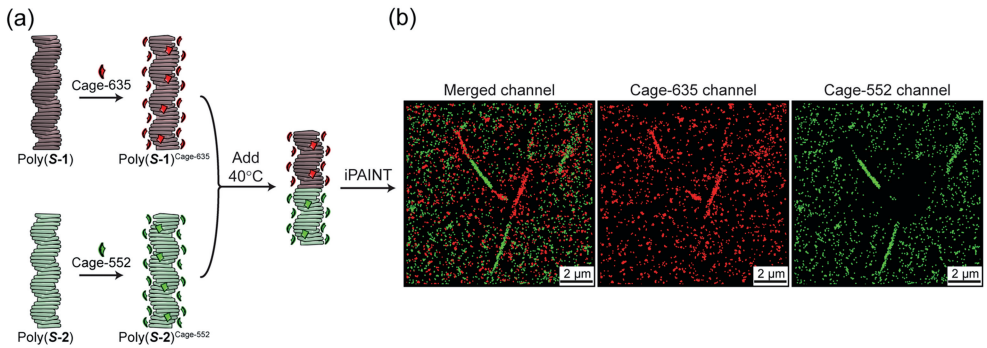


图 7 (a)超分子嵌段共聚物的形成示意图和(b)LSCM 图像^[32]
Figure 7 (a) Schematic illustration of formation and (b) LSCM images of supramolecular block copolymers^[32]

团的两亲性聚合物,基于碳酸钙模板的方法制备了微凝胶。微凝胶能很好地分散在水中,表现出明亮而稳定的自发荧光。利用 LSCM 观察了微凝胶被细胞吞噬的行为,结果显示,共同孵育 24h 后,内在的微凝胶主要分布在细胞质中,部分分布在细胞核周围(见图 8)。

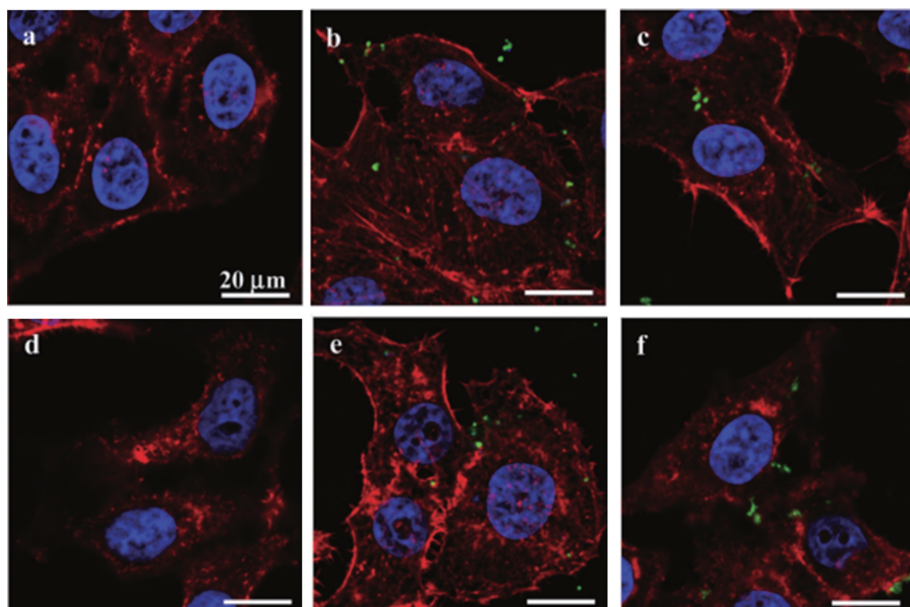


图 8 微凝胶与细胞(15 : 1)共同孵育 24h 后的 LSCM 图像

其中,蓝色为细胞核、红色为细胞骨架、绿色为微凝胶粒子^[36]。

Figure 8 LSCM images of the cells treated with MGs at a particle/cell ratio of 15/1 for 24h

The cell nuclei showing blue, cytoskeleton showing red and MGs showing green^[36].

聚合物微针不仅具有足够的机械强度刺穿皮肤角质层,而且具有优异的生物相容性、载药量可调节范围大等特点,即使断裂在皮肤内,也不会产生安全问题^[37~39]。LSCM 可用来表征聚合物微针负载药物释放行为,利用 LSCM 对微针作用后的皮肤组织进行观察,在 Z 轴方向进行逐层扫描,通过重叠不同 Z 轴高度的 XY 平面图像获得三维重建图像,来追踪荧光标记后的药物在皮下的扩散情况。Wang 等^[39]制备了一种由可降解的交联聚乙烯醇凝胶组成的核壳结构微针,该微针可自我调节胰岛素的释放,能够快速降低血糖。微针的核部分包含葡萄糖氧化酶,可生成 H_2O_2 以刺激胰岛素释放,而壳部分嵌入了过氧化氢酶(CAT),作为过滤器有效地清除过量的 H_2O_2 ,从而最大程度地减少了 H_2O_2 引起炎症的风险。LSCM 表征结果表明该微针确实为核壳结构,其针头呈圆锥形,底径为 $300\mu m$,尖端为 $5\mu m$,高度为 $600\mu m$ (见图 9)。

4 结语

LSCM 是普通显微镜质的飞跃,是对电子显微镜的补充,具有独特的激光扫描成像方式及精确的计算机测量定位系统,其高分辨率、高灵敏度和空间结构灵活性观察的独特优势,目前已成为一项应用非常广泛的全新科研实验手段和必备研究工具,为许多研究者提供了强有力的技术支持和全新的探索思路。综上所述,近年来 LSCM 在分子科学研究领域中的创新应用,主要包括聚合物多组分体系、聚合物颗粒、聚合物膜、嵌段共聚物自组装以及药物控释表征等。随着分辨率的不断提高,LSCM 可观察到更小尺寸的高分子纳米颗粒,但由于其成像仅适用于半透明的样品,很可能会限制其在高分子学科中的部分应用。LSCM 与其它先进的检测技术联合应用,如拉曼光谱仪、AFM 等,以提供更丰富的组成信息和更高精度的精细结构,将是其在高分子研究中应用的发展趋势。总而言之,随着光学物理的发展、工作原理和显微镜各个系统的革新以及多学科之间的相互交叉,相信 LSCM 在分子科学研究中会有更广阔的发展前景。

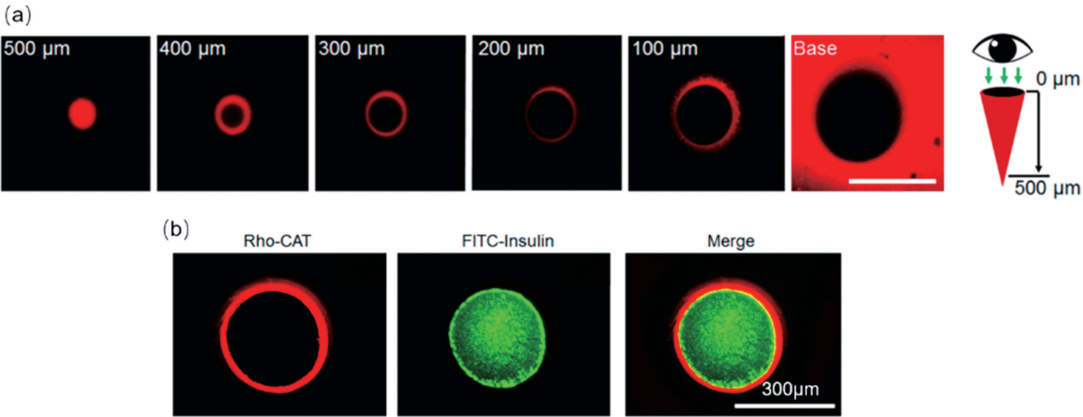


图 9 (a)中空微针的底视 LSCM 切片图, z 方向的间隔设置为 $100\mu\text{m}$; (b)冷冻切片的核壳微针横截面 LSCM 图: 罗丹明 B 标记的 CAT 壳(红色), FITC 标记的胰岛素(绿色)及其叠加图^[39]

Figure 9 (a) The LSCM images of a bottom view of hollow Microneedles. The intervals at z -direction were set as $100\mu\text{m}$; (b) LSCM images of a cross-section of core-shell Microneedle using cryosection: rhodamine B labeled CAT shell (red), FITC labeled insulin (green), and their overlap^[39]

参考文献:

[1] Fldes Papp Z, Demel U, Tilz G P. *Int Immunopharmacol*, 2003, 3(13-14): 1715~1729.

[2] Paddock S W, Eliceiri K W. *Methods Mol Biol*, 2014, 1075: 9~47.

[3] Tovey S C, Brighton P J, Bampton E T W, Huang Y, Willars G B. *Methods Mol Biol*, 2012, 937: 51~93.

[4] Brakenhoff G J, Van d V H T M, Van Spronsen E A, Linnemans W A M, Nanninga N. *Nature*, 1985, 317(6039): 748~749.

[5] Hovis D B, Heuer A H. *J Microsc*, 2010, 240(3): 173~180.

[6] 刘东武, 牟洪善. *生命科学仪器*, 2006, 4(5): 11~14.

[7] Hanlon D N, Todd I, Peekstok E, Rainforth W M, Zwaag S V D. *Wear*, 2001, 251(2): 1159~1168.

[8] Paddock S W. *Methods Mol Biol*, 2000, 16(2): 127~149.

[9] Kubota R, Nakamura K, Torigoe S, Hamachi I. *Chemistryopen*, 2020, 9(1): 67~79.

[10] Pujals S, Feiner Gracia N, Delcanale P, Voets I, Albertazzi L. *Nat Rev Chem*, 2019, 3(2): 68~84.

[11] 马亢, 周庆峰, 施传信, 裴冬丽, 闫永峰. *农学学报*, 2016, 6(6): 30~35.

[12] Schermelleh L, Ferrand A, Huser T, Eggeling C, Sauer M, Biehlmaier O, Drummen G P C. *Nat Cell Biol*, 2019, 21(1): 72~84.

[13] 金熹高, 朱世雄, 贾世军, 陈柳生. *化学通报*, 1999, 6: 34~39.

[14] Verhoogt H, Vandam J, Deboer A P, Draaijer A, Hout P M. *Polymer*, 1993, 34(6): 1325~1329.

[15] Li L, Sosnowski S, Chaffey C E, Balke S T, Winnik M A. *Langmuir*, 1994, 10(8): 2495~2497.

[16] Zhu S, Jin X, Chen L, He Q. *Sci China Ser B*, 1998, 41(5): 549~555.

[17] 郑学晶. *化工进展*, 2007, 26(12): 1695~1701.

[18] Jang Y J, Bieber K, Naundorf C, Nenov N, Kapper M, Mullen K, Ferrari D, Knoke S, Fink G. *e-Polymers*, 2005, 13.

[19] Jung Y J, Naundorf C, Klapper M, Mullen K. *Macromol Chem Phys*, 2005, 206(20): 2027~2037.

[20] Liu B, Chu B, Wang Y L, Chen Z, Zhang X H. *Adv Opt Mater*, 2020, 8(14): 1~7.

[21] 马莉华, 于炜婷, 马小军. *膜科学与技术*, 2005, 25(2): 30~33.

[22] Heint M, Greiner S, Wudy K, Pobel C, Rasch M, Huber F, Papke T, Merklein M, Schmidt M, Korner C, Drummer D, Hausotte T. *Meas Sci Technol*, 2020, 31(19): 1~14.

[23] Nau M, Herzog N, Schmidt J, Meckel T, Andrieu Brunsen A, Biesalski M. *Adv Mater Interfaces*, 2019, 6(18): 1~8.

[24] Zhu X B, Zhou Y H, Hao J R, Bao B, Bian X J, Jiang X Y, Pang J H, Zhang H B, Jiang Z H, Jiang L A. *Acs Nano*, 2017, 11(11): 10816~10824.

[25] Cznotka E, Jeschke S, Schmohl S, Johansson P, Wiemhofer H D. *J Coat Technol Res*, 2016, 13(4): 577~587.

[26] Qiu H B, Hudson Z M, Winnik M A, Manners I. *Science*, 2015, 347(6228): 1329~1332.

[27] Hudson Z M, Boott C E, Robinson M E, Rupar P A, Winnik M A, Manners I. *Nat Chem*, 2014, 6(10): 893~898.

- [28] Boott C E, Laine R F, Mahou P, Finnegan J R, Leitao E M, Webb S E D, Kaminski C F, Manners I. *Chem Eur J*, 2015, 21(51): 18539~18542.
- [29] Deng Y, Chen H, Tao X, Cao F, Trépout S, Ling J, Li M. *Biomacromolecules*. 2019, 20(9): 3435~3444.
- [30] Albertazzi L, van der Zwaag D, Leenders C M A, Fitzner R, van der Hofstad R W, Meijer E W. *Science*, 2014, 344(6183): 491~495.
- [31] Shaikh H, Jin X H, Harniman R L, Richardson R M, Whittell G R, Manners I. *J Am Chem Soc*, 2020, 142(31): 13469~13480.
- [32] Adelizzi B, Aloï A, Markvoort A J, Ten Eikelder H M M, Voets I K, Palmans A R A, Meijer E W. *J Am Chem Soc*, 2018, 140(23): 7168~7175.
- [33] Adelizzi B, Aloï A, Van Zee N J, Palmans A R A, Meijer E W, Voets I K. *Acs Nano*, 2018, 12(5): 4431~4439.
- [34] Yang Q, Wang K, Nie J J, Du B Y, Tang G P. *Biomacromolecules*, 2014, 15(6): 2285~2293.
- [35] Zhang W B, Li H Y, Qin Y, Gao C Y. *Mater Horizons*, 2017, 4(6): 1135~1144.
- [36] Zhai Z H, Zhang W B, Ding N, Lin X, Gao C Y. *Mat Chem Front*, 2019, 3(2): 233~241.
- [37] 赵笑, 李欣芳, 张鹏, 王幽香. *化学进展*, 2017, 29(12): 1518~1525.
- [38] Than A, Liu C H, Chang H, Duong P K, Cheung C M G, Xu C J, Wang X M, Chen P. *Nat Commun*, 2018, 9: 1~12.
- [39] Wang J, Ye Y, Yu J, Kahkoska A R, Zhang X, Wang C, Sun W, Corder R D, Chen Z, Khan S A, Buse J B, Gu Z. *ACS Nano*, 2018, 12(3): 2466~2473.

Application of Laser Scanning Confocal Microscopy in the Study of Polymer Science

ZHANG Ying-ying, GUO Yi, SHEN Lie*

(MOE Key Laboratory of Macromolecular Synthesis and Functionalization, Department of Polymer Science and Engineering, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China)

Abstract: Laser scanning confocal microscopy is an important research method for the analysis of internal structure of materials without complex experimental operation and prior sample destruction. It can give a three-dimensional image of the internal structure directly and is widely used in the research of biology, medicine, materials science and metallurgy, etc. This paper introduced the working principle and advantages of laser scanning confocal microscope. Moreover, the application progress in the field of polymer science was summarized, which includes polymer multi-component systems, polymer particles, polymer films, self-assembly of block copolymers, and controlled release of drugs, in order to provide useful reference for more scientific researchers.

Key words: Laser scanning confocal microscopy; Polymer Science; Application