仿生水凝胶结构特性的超分辨率荧光成像

张国峰, 陈瑞云, 高岩, 于波, 秦成兵, 肖连团*, 贾锁堂

山西大学激光光谱研究所, 量子光学与光量子器件国家重点实验室, 太原 030006

* 联系人, E-mail: xlt@sxu.edu.cn

2014-10-14 收稿, 2014-12-09 接受, 2015-04-10 网络版发表

国家重点基础研究发展计划(2012CB921603)、国家高技术研究发展计划(2011AA010801)、国家自然科学基金(11374196, 11174187, 10934004, 11204166, 11404200)、国家国际科技合作专项(2001DFA12490)、国家自然科学基金创新研究群体科学基金(61121064)、长江学者和创新团队发展计划(IRT13076)、教育部博士点基金(20121401120016)和山西省留学回国人员科技活动择优项目资助

摘要 基于聚异氰脲酸合成的热功能化的仿生水凝胶具有与细胞骨架中的肌动蛋白丝、中间丝相同的结构特性, 在生物医学领域中具有广阔的应用前景. 本文将荧光探针分子ALEXA647标记在仿生水凝胶的聚合物链上, 利用全内反射荧光显微镜进行荧光成像, 并采用超分辨率光学波动成像的方法(SOFI)对仿生水凝胶的荧光成像进行超分辨率成像分析. 通过SOFI成像及反卷积处理获得了高分辨率、高信噪比和高对比度的仿生水凝胶荧光成像. SOFI成像使得水凝胶的网状结构和各聚合链之间的绑定方式实现了可视化, 研究发现较高的聚合物链溶液浓度不会形成更粗的聚合链绑定, 而是使绑定形成的网状结构的孔径更小. 另外观测了溶液环境下的仿生水凝胶的特性.

关键词

仿生水凝胶
聚合物链
超分辨率
荧光成像
光学波动

细胞中的蛋白纤维网络结构是构成细胞的骨架, 主要包括微管、肌动蛋白丝及中间丝等^[1]. 细胞骨架能够维持细胞形态、承受外力和保持细胞内部结构的有序性. 细胞骨架同时也参与许多重要的生命活动^[2], 如在细胞分裂中细胞骨架牵引染色体分离; 在细胞物质运输中各类小泡和细胞器可沿着细胞骨架定向转运; 在肌肉细胞中细胞骨架和它的结合蛋白组成动力系统; 在白细胞的迁移、精子的游动、神经细胞轴突和树突的伸展等生命活动都与细胞骨架有关. 人造的细胞骨架仿生水凝胶^[3~5]具有与细胞骨架相同的形状尺寸、绑定方式、力学特性和解聚性质等. 仿生水凝胶已经被应用于药物的传输体系, 实现对药物释放速率的控制^[6], 以及人体器官的移植^[7,8]等. 高弹性、高韧性的仿生水凝胶的开发将有望用于制作人造软骨等人体组织^[9,10]. 这里我们研究由人工合成的聚合物链进行凝胶而形成的仿生水凝胶的结构特性.

通常原子力显微镜(AFM)被用来研究仿生水凝胶的结构特性^[5]. AFM成像虽然可以获得聚合物链的绑定数目, 但是其扫描速率较慢、成像范围较小且不能够实时追踪样品的动态转变过程, 而光学成像的方法可以弥补这些不足. 但是由于受到光学衍射极限的影响, 远场显微镜的分辨率只能达到约300 nm. 这样的分辨能力对于细胞、组织等微观生物样品的成像是远远不够的. 近年来人们根据具体的实际需要已经开发了几种能够突破光学衍射极限的超分辨率荧光成像方法, 如受激辐射损耗显微镜(STED)^[11,12]、基态损耗显微镜^[13]、结构照明显微镜(SIM)^[14,15]和成像干涉显微镜^[16]等. 另外基于随机光开关的技术发展了光活化定域显微镜(PALM)^[17,18]和随机光学重构显微镜(STORM)^[19,20]等. 但是这些超分辨率成像的方法各有一些不足之处, 如PALM和STORM可以实现纳米量级的分辨率, 但需要花费几十分钟甚至更长的成像采集时间; STED虽然可以快速成像, 但是

引用格式: 张国峰, 陈瑞云, 高岩, 等. 仿生水凝胶结构特性的超分辨率荧光成像. 科学通报, 2015, 60: 1191–1196

Zhang G F, Chen R Y, Gao Y, et al. Super-resolution fluorescence imaging of structure property of biomimetic hydrogels (in Chinese). Chin Sci Bull, 2015, 60: 1191–1196, doi: 10.1360/N972014-01071

<https://engine.scichina.com/doi/10.1360/N972014-01071>

在探针分子的选择、样品标记过程方面要求非常苛刻并且需要非常精密的光路准直; SIM可以达到11 Hz的成像率, 但是仅能实现2倍的横向分辨率. 这里我们利用超分辨率光学波动成像的方法(SOFI)^[21]首次对仿生水凝胶进行超分辨成像. 基于对荧光辐射体在时序上的荧光波动(荧光辐射的间歇现象)的分析, SOFI成像可以突破光学衍射极限. 相比于其他技术, SOFI成像具有明显的优势: 对成像背景噪声免疫可以进一步增强成像的对比度; 成像采集时间仅需要十几秒至几十秒; 不需要控制、同步光活化和复杂的电子系统设备. SOFI成像需要满足3个条件, 即荧光辐射体的荧光辐射需要具有亮暗两个态(或具有荧光强度可区分的多个态)、不同的荧光辐射体之间的荧光发射相互独立和成像CCD像素尺寸小于光学衍射极限. 这里我们将利用SOFI成像的方法研究仿生水凝胶的结构、聚合物链之间的绑定方式和溶液环境下仿生水凝胶的特性.

1 样品制备和实验方法

实验内容主要包括3个方面, 仿生水凝胶成像样品的制备、全内反射荧光显微镜和SOFI成像的原理及数据分析方法.

1.1 仿生水凝胶成像样品的制备

形成仿生水凝胶的聚合物链是由聚异氰缩氨酸的螺旋结构主链和低聚乙二醇支链制备而成, 当温度升高到凝胶温度以上时聚合物链进行绑定聚合形成仿生水凝胶, 当温度降低到凝胶温度以下时仿生水凝胶进行解聚恢复为分散的聚合物链. 荧光染料分子ALEXA647用于标记仿生水凝胶样品, 染料分子通过化学键键合的方式标记在水凝胶聚合物的支链上. ALEXA647染料分子的最大激发波长为650 nm, 最大荧光辐射波长为665 nm, 荧光辐射的亮态和暗态服从幂律分布^[22-24]. 该仿生水凝胶的凝胶温度为42℃. 首先将浓度为2 mg/mL的水凝胶溶液稀释至 2×10^{-3} mg/mL, 为了防止溶液中出现早期的凝胶, 稀释过程是将装有水凝胶的试剂瓶置于冰水混合液的环境下进行的. 将稀释后的溶液加热至50℃保持约10 min使聚合物链进行胶化形成水凝胶. 将此时的水凝胶溶液滴到旋涂有聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)聚合物薄膜的盖玻片表面, 样品玻片保持在50℃的环境下逐渐蒸发掉溶液中的水分, 使水凝胶固定在

PMMA薄膜的表面.

1.2 全内反射荧光显微镜

SOFI成像基于常规的全内反射荧光(TIRF)显微镜. 一台奥林巴斯IX71倒置荧光显微镜作为TIRF成像的主体, 波长为650 nm的半导体激光器作为激发光源. 线偏振激光束分别通过一个 $\lambda/2$ 和一个 $\lambda/4$ 波片形成圆偏光后通过10倍扩束器扩束, 然后经过焦距为50 cm的聚焦透镜, 经二向色镜(ZT640rdc, Chroma Technology Co.)反射后聚焦到显微镜物镜(PlanApo 60x Oil TIRF, NA=1.45)的后焦面上. 从显微镜物镜出射的平行激光束激发制备在玻片上的仿生水凝胶样品. 样品中染料分子ALEXA647发出的荧光由相同的显微镜物镜收集, 通过二向色镜和一个长通滤波器(ET655LP, Chroma Technology Co.)滤波后通过一个放大倍率为3.3倍的成像透镜后进入EMCCD(ImagEM, Hamamatsu)成像. EMCCD的像素为 512×512 , 每个像素单元的尺寸为 $16 \mu\text{m} \times 16 \mu\text{m}$. EMCCD成像范围对应于仿生水凝胶样品的成像区域约为 $41 \mu\text{m} \times 41 \mu\text{m}$. 用EMCCD采集大约2000帧成像序列, 每一帧图像的采样积分时间为100 ms.

1.3 SOFI成像原理及分析方法

SOFI成像是基于计算每个像素所对应的成像序列上的强度时间轨迹曲线的 n 阶累积量, 这里的 n 阶累积量可以通过计算 n 阶关联函数来获得. 荧光染料单分子可以看作一个点光源, 由于成像元件的衍射效应, 点光源会在EMCCD的接收面上形成一个光斑. 如果两个邻近的荧光辐射体之间的距离小于光学衍射极限距离, 那么这两个荧光辐射体的成像光斑是不能分开的. 在 N 帧的成像序列上的每一个像素都包含有由 N 个强度值组成的强度时间轨迹曲线, 通过计算每个像素上的强度时间轨迹曲线的关联函数, 并对关联函数积分可以获得每个像素上的SOFI成像的强度值. 由于每个荧光辐射体都具有独立的荧光间歇效应, 相同像素上来自不同的荧光辐射体的荧光的关联性较差, 所有通过SOFI成像处理后构成的新的成像具有较高的成像分辨率. 通过计算不同阶数的关联函数可以获得不同分辨率的SOFI成像, 高阶的SOFI成像可以获得 ~ 60 nm的空间分辨率^[21]. 另外, 成像的背景噪声与荧光信号是完全不关联的, 所以SOFI成像可极大地提高成像的信噪比, 信噪改善比

可达130倍^[21]. 更具体的SOFI成像原理及分辨率的计算方法等请参考文献[21]. 本文中的SOFI成像的算法分析及反卷积处理是基于Igor Pro软件的Localizer程序.

2 结果和讨论

2.1 仿生水凝胶的SOFI成像

由EMCCD采集大约2000帧成像序列, 然后选取其中的500帧成像序列由SOFI算法程序对其进行SOFI成像分析. 标记有ALEXA647染料分子的仿生水凝胶的荧光成像(原始成像)、二阶SOFI成像及对SOFI成像进行反卷积处理后的成像分别如图1(a)~(c)所示. 图1(a)为水凝胶的荧光成像, 可以发现水凝胶网状结构的轮廓特征, 但是由于光学衍射极限的影响水凝胶上的聚合物链之间的纠缠、绑定情况十分模糊. 图1(b)是对(a)图中的荧光成像进行SOFI分析得到的二阶SOFI成像, 各聚合物链之间的纠缠绑定情况清晰可见, 同时由于背景噪声与分子荧光之间无关联性使得SOFI成像具有非常高的信噪比. 图1(c)为对SOFI成像(b)图进行反卷积(Richardson-Lucy算法)处理获得的成像, 可以发现反卷积处理消除了显微

镜系统对成像结果的影响从而可以获得更清晰的成像. 图1(d)~(f)为(a)~(c)图中的白色方框区域的放大显示, 通过比较图中白色虚线位置可以看到图1(e)比图1(d)具有更多的细节显示, 粗的聚合物链是由2~3个较细的聚合物链绑定形成的. 反卷积算法处理后得到的图1(f)则显示了更高的对比度和清晰度. 根据参考文献[21]对实验数据的拟合推算得到的二阶SOFI成像的空间分辨率约为203 nm. 这里我们只做了二阶SOFI成像分析, 更高阶数的SOFI成像会使成像图中产生非常大的荧光强度差(高阶SOFI成像能放大样品荧光的异构性, 从而限制了高阶SOFI成像的应用)从而不能够获得理想的成像效果^[21]. 最近发展的可以平衡成像对比度的bSOFI成像能够解决某些样品SOFI成像的这一缺陷^[23].

2.2 仿生水凝胶的网状结构

仿生水凝胶具有与肌动蛋白丝、中间丝相类似的结构和性质, 通过SOFI成像可以在更小的尺度上更好的观察和研究仿生水凝胶的结构形式和绑定方式. 在图2中显示了一个典型的水凝胶结构, 可以观察到类似渔网形式的网状结构, 该网状结构并不是由简单规则的网格组成的而是由大小两类孔径交替构成

图1 (网络版彩色)标记有 ALEXA647 染料分子的仿生水凝胶的荧光成像和 SOFI 成像. (a) 仿生水凝胶的荧光成像; (b) 对(a)中的荧光成像进行 SOFI 分析得到的二阶 SOFI 成像; (c) 对 SOFI 成像(b)进行反卷积处理得到的成像; (d)~(f)为(a)~(c)中的白色方框区域的放大显示

Figure 1 (Color online) Wide-field and SOFI images of biomimetic hydrogels labeled with ALEXA647 dyes. (a) Wide-field image of biomimetic hydrogels; (b) second-order SOFI image; (c) the image in (b) deconvolved; (d)~(f) magnified views of the boxed regions in (a)~(c)

图2 (网络版彩色)仿生水凝胶的大小孔隙相间的网状结构

Figure 2 (Color online) Network structure of biomimetic hydrogels with various pore sizes

的。图中白色方框中的区域显示了一个直径约有 $0.8\ \mu\text{m}$ 的大孔,在大孔的边缘分布着一些直径大约为 $0.1\sim 0.2\ \mu\text{m}$ 的小孔。这是因为聚合物链形成水凝胶时单个聚合物链相互缠绕凝胶形成较粗的聚合物链,较粗的聚合物链相互缠绕后形成小孔然后继续缠绕形成大孔,最终形成一个大小孔径相间的网状结构。通过观察图中凝胶后较粗的聚合物链可以发现这些聚合物链的直径近似相同。通过对单个的聚合物链及凝胶后形成较粗的聚合物链的AFM成像进行统计分析和比较,发现较粗的聚合物链平均大约由7条单个聚合物链绑定形成^[5]。仿生水凝胶的这种绑定特性主要由热诱导作用所控制,热诱导凝胶过程归因于聚合物链骨架上修饰的乙二醇基团的疏水性,在加热的作用下会导致乙二醇支链熵的去溶剂化从而产

生更多的疏水链使得水凝胶从水性溶液中分离出来^[25-27]。

2.3 溶液浓度对仿生水凝胶结构的影响

利用各种不同聚合物链浓度的溶液在盖玻片上制备了不同的仿生水凝胶样品,测量了这些样品的荧光成像并对荧光成像进行SOFI成像分析和反卷积处理。通过比较和分析这些不同浓度的聚合物链的仿生水凝胶样品的成像,发现聚合物链的绑定数目保持一个恒定的值,也就是说更高浓度的聚合物链溶液不会绑定形成更粗的聚合物链,而是形成孔隙更多孔径更小的网状结构。如在图3中显示了两个不同聚合物链浓度的仿生水凝胶,图3(a)中浓度为 $0.002\ \text{mg/mL}$ 的较低浓度的聚合物链绑定形成的仿生水凝胶具有非常大的孔径(白色方框所标记的区域),这些大孔的直径大约为 $3\sim 4\ \mu\text{m}$ 。在图3(b)中浓度为 $0.03\ \text{mg/mL}$ 的较高浓度的聚合物链形成的仿生水凝胶具有相对较小的孔径约 $1\sim 2\ \mu\text{m}$ (白色方框所标记的区域)。可见聚合物链的浓度主要控制着水凝胶的孔径尺寸和孔隙的疏密分布。这种性质被认为是由材料的手性特性(螺旋结构)和聚合物链固有的刚性所决定的^[28]。

2.4 水溶液中的仿生水凝胶

为了研究溶液中的仿生水凝胶的凝胶形成过程,我们利用荧光成像的方法跟踪测量了从聚合物链到水凝胶的转变过程。首先将温度可调的恒温器安装

图3 (网络版彩色)不同聚合物链浓度下的仿生水凝胶的网状结构。(a) 聚合物链浓度为 $0.002\ \text{mg/mL}$ 的仿生水凝胶的网状结构;(b) 聚合物链浓度为 $0.03\ \text{mg/mL}$ 的仿生水凝胶的网络结构

Figure 3 (Color online) Network structures of biomimetic hydrogels with different polymer concentrations. (a) Network structures of biomimetic hydrogels with polymer concentration of $0.002\ \text{mg/mL}$; (b) network structures of biomimetic hydrogels with polymer concentration of $0.03\ \text{mg/mL}$

图 4 (网络版彩色)水凝胶溶液中的水蒸发前后的仿生水凝胶成像。(a) 溶液中的仿生水凝胶; (b) 仿生水凝胶溶液中的水蒸发后浮现出的仿生水凝胶

Figure 4 (Color online) Images of biomimetic hydrogels in aqueous solution and without water. (a) Biomimetic hydrogels in aqueous solution; (b) image of biomimetic hydrogels after water evaporation

在TIRF显微镜的载物台上并设置温度为50℃。由于该仿生水凝胶的凝胶温度为42℃,所以在50℃的环境下聚合物链会很快进行纠缠绑定形成水凝胶网状结构^[5]。将一块制备有PMMA聚合物薄膜的盖玻片放置在显微镜物镜上方的恒温器内,加热大约10 min后使盖玻片的温度达到50℃。此时打开EMCCD并调节调焦旋钮在盖玻片的上表面位置成像,将浓度为0.03 mg/mL的仿生水凝胶溶液滴在盖玻片表面,上下调节显微镜的调焦旋钮观察玻片表面的仿生水凝胶溶液。成像图中只能看到少数发光的分子,而并没有发现仿生水凝胶,如图4(a)所示。这可能是因为仿生水凝胶的聚合物链在50℃的水溶液中虽然可以绑定凝胶但是不能固定在水中,在水中快速地运动或者是作布朗运动等。尽管仿生水凝胶上标记有发

光的荧光染料分子,但是由于仿生水凝胶在水中快速地运动,使得EMCCD不能够捕捉到仿生水凝胶。在大约1 h后,随着仿生水凝胶溶液中的水分完全蒸发,仿生水凝胶逐渐显现出来,如图4(b)所示。为了进一步观察和研究仿生水凝胶在液体中的性质,我们将温度大约为50℃的水滴在显现出仿生水凝胶的盖玻片上,同时用EMCCD观察。发现仿生水凝胶在滴入水滴的瞬间消失,直至水分再次完全蒸发后仿生水凝胶才又显现出来。前面提到的bSOFI成像方法需要在缓冲溶液等中进行以增加染料分子的荧光闪烁^[23],所以bSOFI成像的方法不适用于该仿生水凝胶的成像。

3 结论

通过对仿生水凝胶的荧光成像进行SOFI成像分析及反卷积处理我们获得了高信噪比、高对比度和高分辨率的仿生水凝胶成像。研究发现聚合物链形成仿生水凝胶时首先相互缠绕形成较粗的聚合物链,然后再经过相互缠绕后依次先形成小孔然后形成大孔,最终形成一个大小孔径相间的网状结构。聚合物链的浓度控制着仿生水凝胶的孔径尺寸和孔隙的疏密分布,而聚合物链的绑定数目不受聚合物链浓度的影响。由于水凝胶在水中快速地运动使得不能够捕捉到溶液中的仿生水凝胶。

参考文献

- 1 Fletcher D A, Mullins D. Cell mechanics and the cytoskeleton. *Nature*, 2010, 463: 485–492
- 2 Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. *Molecular Biology of the Cell*. 5th ed. New York: Garland Science, 2007
- 3 Schwartz E, Le Gac S, Cornelissen J J L M, et al. Macromolecular multi-chromophoric scaffolding. *Chem Soc Rev*, 2010, 39: 1576–1599
- 4 Cornelissen J J L M, Donners J J J M, de Gelder R, et al. Beta-helical polymers from isocyanopeptides. *Science*, 2001, 293: 676–680
- 5 Kouwer P H J, Koepf M, Le Sage V A A, et al. Responsive biomimetic networks from polyisocyanopeptide hydrogels. *Nature*, 2013, 493: 651–655
- 6 Qiu Y, Park K. Environment-sensitive hydrogels for drug delivery. *Adv Drug Del Rev*, 2001, 53: 321–339
- 7 Lee K Y, Mooney D J. Hydrogels for tissue engineering. *Chem Rev*, 2001, 101: 1869–1879
- 8 Park H, Kang S W, Kim B S, et al. Shear-reversibly crosslinked alginate hydrogels for tissue engineering. *Macromol Biosci*, 2009, 9: 895–901
- 9 Sun J Y, Zhao X H, Illeperuma W R K, et al. Highly stretchable and tough hydrogels. *Nature*, 2012, 489: 133–136
- 10 Calvert P. Hydrogels for soft machines. *Adv Mater*, 2009, 21: 743–756
- 11 Hell S W, Wichmann J. Breaking the diffraction resolution limit by stimulated emission: Stimulated-emission-depletion fluorescence microscopy. *Opt Lett*, 1994, 19: 780–782
- 12 Willig K I, Rizzoli S O, Westphal V, et al. Sted microscopy reveals that synaptotagmin remains clustered after synaptic vesicle exocytosis. *Nature*, 2006, 440: 935–939
- 13 Hell S W, Kroug M. Ground-state-depletion fluorescence microscopy—a concept for breaking the diffraction resolution limit. *Appl Phys B: Lasers Optics*, 1995, 60: 495–497

- 14 Gustafsson M G L. Surpassing the lateral resolution limit by a factor of two using structured illumination microscopy. *J Microsc-Oxford*, 2000, 198: 82–87
- 15 Heintzmann R, Jovin T M, Cremer C. Saturated patterned excitation microscopy—a concept for optical resolution improvement. *J Opt Soc Am A*, 2002, 19: 1599–1609
- 16 Gustafsson M G L, Agard D A, Sedat J W. (im)-m-5: 3D widefield light microscopy with better than 100 nm axial resolution. *J Microsc-Oxford*, 1999, 195: 10–16
- 17 Hess S T, Girirajan T P K, Mason M D. Ultra-high resolution imaging by fluorescence photoactivation localization microscopy. *Biophys J*, 2006, 91: 4258–4272
- 18 Betzig E, Patterson G H, Sougrat R, et al. Imaging intracellular fluorescent proteins at nanometer resolution. *Science*, 2006, 313: 1642–1645
- 19 Rust M J, Bates M, Zhuang X W. Sub-diffraction-limit imaging by stochastic optical reconstruction microscopy (storm). *Nat Methods*, 2006, 3: 793–795
- 20 Heilemann M, van de Linde S, Schüttelz M, et al. Subdiffraction-resolution fluorescence imaging with conventional fluorescent probes. *Angew Chem Int Edit*, 2008, 47: 6172–6176
- 21 Dertinger T, Colyer R, Iyer G, et al. Fast, background-free, 3D super-resolution optical fluctuation imaging (sofi). *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106: 22287–22292
- 22 Orrit M. Chemical and physical aspects of charge transfer in the fluorescence intermittency of single molecules and quantum dots. *Photoch Photobio Sci*, 2010, 9: 637–642
- 23 Geissbuehler S, Bocchio N L, Dellagiacoma C, et al. Mapping molecular statistics with balanced super-resolution optical fluctuation imaging (bsofi). *Opt Nanoscopy*, 2012, 1: 1–7
- 24 Geissbuehler S, Dellagiacoma C, Lasser T. Comparison between sofi and storm. *Biomed Opt Express*, 2011, 2: 408–420
- 25 Han S, Hagiwara M, Ishizone T. Synthesis of thermally sensitive water-soluble polymethacrylates by living anionic polymerizations of oligo(ethylene glycol) methyl ether methacrylates. *Macromolecules*, 2003, 36: 8312–8319
- 26 Lutz J F, Hoth A. Preparation of ideal peg analogues with a tunable thermosensitivity by controlled radical copolymerization of 2-(2-methoxyethoxy)ethyl methacrylate and oligo(ethylene glycol) methacrylate. *Macromolecules*, 2006, 39: 893–896
- 27 Wang H M, Yang C H, Tan M, et al. A structure-gelation ability study in a short peptide-based 'super hydrogelator' system. *Soft Matter*, 2011, 7: 3897–3905
- 28 Grason G M, Bruinsma R F. Chirality and equilibrium biopolymer bundles. *Phys Rev Lett*, 2007, 99: 098101

Super-resolution fluorescence imaging of structure property of biomimetic hydrogels

ZHANG GuoFeng, CHEN RuiYun, GAO Yan, YU Bo, QIN ChengBing,
XIAO LianTuan & JIA SuoTang

State Key Laboratory of Quantum Optics and Quantum Optics Devices, Institute of Laser Spectroscopy, Shanxi University, Taiyuan 030006, China

Biomimetic hydrogels have a wide variety of applications in the biomedical field. Functional biomimetic hydrogels which are based on polyisocyanopeptides have the same structure property as actin microfilaments and intermediate filaments of cytoskeleton. ALEXA647 dyes are labeled onto polymer chains of hydrogels, and total internal reflection fluorescence microscopy is used to image the hydrogels. Super-resolution fluorescence images for hydrogels are achieved by super-resolution optical fluctuation imaging (SOFI) and deconvolution. The SOFI imaging also features significant background reduction and thus contrast enhancement. Network structures of hydrogels and bundles of polymer chains are visualized by SOFI imaging. It is found that bundle dimensions are constant irrespective of polymer concentration and network structures have smaller pore sizes at higher concentration. The property of biomimetic hydrogels in aqueous solution is also observed.

hydrogels, polymer chains, super-resolution, fluorescence imaging, optical fluctuation

doi: 10.1360/N972014-01071