

· 研究论文 ·

微流控剪切条件下的聚肽自组装行为

李芊晴 高 梁* 林嘉平* 蔡春华

(华东理工大学材料科学与工程学院 上海 200237)

摘 要 微流控通道中独特的剪切环境为构筑复杂纳米结构带来了新的机遇. 本研究设计了一种环型微流控通道, 利用剪切作用使刚性聚肽形成与溶液自组装不同的扭曲状聚集体. 通过调控剪切速率和含水量, 结合圆二色谱(CD)与同步辐射广角X射线衍射测试(WAXS), 探究了聚(γ -苄基-L-谷氨酸酯) (PBLG)形成扭曲状聚集体的机理. 在选择性溶剂(水)的剪切作用下, 聚肽链间距减小、链有序排列更紧密, 同时其 α -螺旋构象向PPII-螺旋构象转变, 这使聚集体产生内扭力, 因而在剪切条件下发生形貌转变, 形成新颖的扭曲状形貌结构. 研究结果为定向设计多级结构提供了新策略.

关键词 微流控, 剪切, 聚肽自组装, 扭曲状聚集体

引用: 李芊晴, 高梁, 林嘉平, 蔡春华. 微流控剪切条件下的聚肽自组装行为. 高分子学报, 2025, 56(11), 2033–2041

Citation: Li, Q. Q.; Gao, L.; Lin, J. P.; Cai, C. H. Self-assembly behavior of polypeptides under microfluidic shear condition. *Acta Polymerica Sinica*, 2025, 56(11), 2033–2041

聚肽自组装可形成形貌丰富的纳米结构, 例如环状、盘状、球状、碗状、囊泡等, 近年来, 基础研究和应用研究在这一领域广泛开展^[1–8]. 而研究的重点是理解和调控这些纳米结构, 因为纳米结构的尺寸和形貌将深刻影响其在特定应用中的有效性, 包括药物载体、仿生矿化添加剂、生物成像等方面^[9–12]. 例如: Lin等通过聚(γ -苄基-L-谷氨酸)-嵌段-聚(乙二醇) (PBLG-*b*-PEG)嵌段共聚物和PBLG均聚物协同自组装制备了3种具有不同表面的棒状聚集体, 并研究了它们的细胞内化情况, 发现螺旋棒状聚集体表现出最佳的内存效果^[12].

纳米结构的调控手段可分为热力学调控和动力学调控. 在传统溶液自组装中通常通过改变溶剂的选择、聚合物浓度、pH等参数, 调节分子间的作用力实现纳米结构的调控^[13–15]. 此类方法通过调节组装最终态的热力学平衡态来获得不同形

貌的纳米结构, 但难以获得复杂且形态丰富的结构. 而动力学调控通过对组装步骤的控制, 获得了一系列具有丰富形态的聚合物纳米结构^[16,17].

微流控为自组装提供了更加精确的动力学调控手段^[18]. 微流控核心在于利用微米级通道的低雷诺数(通常小于2000)特性, 在层流状态下通过改变不同溶剂的混合速率和剪切力等物理参数调节自组装路径, 进而实现纳米结构的动力学调控, 为设计形态多样的聚合物纳米结构打开了新的大门^[19–23]. 例如: Xu等在同轴微流控装置中制备出与溶液自组装不同的分段聚合物纤维, 并通过改变总流速控制聚苯乙烯-嵌段-聚(4-乙烯基吡啶) (PS-*b*-P4VP)的组装动力学, 成功调控分段聚合物纤维的尺寸和分节特征^[22].

然而, 在常规的微流控装置即T型和Y型微混合器中, 其混合过程依赖于流体界面处的物质扩散, 此过程比较缓慢, 需要增加混合时间或混

2025-04-23 收稿, 2025-06-06 录用, 2025-08-14 网络出版.

* 通信联系人, E-mail: lianggao@ecust.edu.cn; jlin@ecust.edu.cn

doi: 10.11777/j.issn1000-3304.2025.25108; CSTR: 32057.14.GFZXB.2025.7437

合通道长度来提高混合效率, 易导致聚集体尺寸分布较宽^[24]. 相比之下, 环型微流控通道通过弯曲通道实现了多股流体的分流和连续混合, 大幅增加了流体间的接触界面区域, 实现了三维层面的层流状态, 使流体之间的混合更加均匀和快速, 这为制备单分散聚集体提供了更可行的手段^[24-28].

为此, 本研究设计了一种环型微流控通道, 系统探究了剪切速率、含水量对PBLG聚肽的自组装行为影响, 旨在揭示微流控通道下聚肽聚集体的形成机理. 实验表明, 在低剪切速率下, 剪切力提供克服粒子间排斥的能量, PBLG聚集形成尺寸较大的棒状聚集体, 增加含水量可以促使棒状聚集体向带有凹陷的棒状聚集体, 再向扭曲状聚集体演化. 其关键是PBLG的链段有序排列和构象调整, 赋予了聚集体独特的内扭力作用. 该研究为微流控技术用于制备聚合物多级结构提供了研究思路.

1 实验部分

1.1 主要实验原料

N,N-二甲基甲酰胺(DMF)、四氢呋喃(THF)、二氧六环(Diox)、三乙胺(TEA)均为分析纯, 购自上海泰坦科技有限公司; 乙酸乙酯为分析纯, 购自上海麦克林生化科技股份有限公司; 石油醚为分析纯, 购自上海玻尔化学试剂有限公司; THF和DMF直接使用, 二氧六环、石油醚、乙酸乙酯经溶剂纯化系统(MB-SPS-5, 德国MBRAUN)纯化后使用. γ -苄基-L-谷氨酸酯五元环酐化合物(BLG-NCA)单体由实验室自制. 超纯水(18.2 M Ω ·cm)由超纯水制备系统(Direct-Q 8 UV Remote)制备. 透析袋(截留分子量1.4 $\times 10^4$ kDa), 购自上海振建生物科技有限公司.

1.2 PBLG均聚物的合成

聚(γ -苄基-L-谷氨酸酯)是在无水二氧六环溶剂中由三乙胺(TEA)引发BLG-NCA进行开环聚合合成的. 该反应在处于干燥氮气氛围下的具支磨口反应瓶中反应3天, 温度为15 $^{\circ}$ C. 反应结束后, 反应产物快速倒入透析袋中(截留分子量1.4 $\times 10^4$ kDa)中, 对水透析3天后, 将透析袋中沉淀物转移至洁净结晶皿中, 冻干后得到PBLG均聚物白色固体粉末. 图1为PBLG均聚物的合成路线.

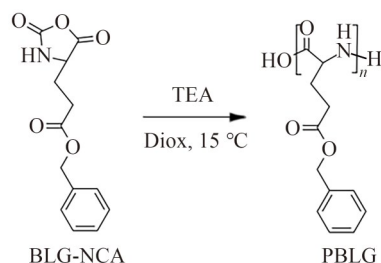


Fig. 1 Synthetic route to PBLG homopolymers.

1.3 组装体的制备

溶液自组装法制备聚集体: 将PBLG溶解在THF/DMF体积比为5/5的混合溶剂中, 初始浓度为0.2 g/L. 在装有2.0 mL聚合物溶液的样品瓶中以5 mL/h的滴水速率滴加去离子水, 直至含水量体积分数为50%, 其中搅拌速率为350 r/min. 将聚集体溶液转移至10倍去离子水中冻结, 最后用去离子水透析3天, 以去除残余的有机溶剂. 所有实验步骤都在恒定温度(4 $^{\circ}$ C)下完成.

微流控自组装法制备聚集体: 两个独立的液体流以不同的流速流动, 在环形微流控通道中混合. 如图2所示, A通道: 溶解在THF/DMF体积比为5/5的0.2 g/L PBLG溶液; B通道: 去离子水. 通过调控两个独立液体流的流速, 可得到不同体积分数的含水量(15%、25%、35%)、不同总流速、不同流速比的聚集体溶液. 冻结透析得到聚集体水溶液. 其中环型微流控通道深度为1000 μ m, 宽度为750 μ m, 圆形混合通道内径为1500 μ m, 外径为3000 μ m.

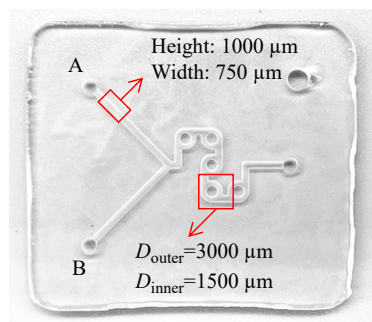


Fig. 2 Image of toroidal microfluidic chip.

通过两步组装法制备聚集体. 第一步: 进行微流控自组装制备得到体积分数15%的聚集体溶液, 收集到样品瓶中. 第二步: 用恒定流量注射泵以5 mL/h的滴水速率向装有棒状聚集体溶液的样品瓶中滴加去离子水, 直至所需的含水量, 其中搅拌速率为350 r/min. 冻结透析得聚集体水溶液.

1.4 测试方法与仪器

1.4.1 聚合物表征

凝胶渗透色谱(GPC)使用 PL-GPC 50 仪器(英国 Varian), 测定聚合物的数均分子量(M_n)和多分散系数(D), 洗脱液为 DMF/LiBr, 溶剂流速为 0.8 mL/min, 用窄分布 PBLG 均聚物作为标准样.

核磁共振氢谱($^1\text{H-NMR}$)使用德国 Bruker, Ascend 600 仪器. 测试频率为 600 MHz. 以氘代氯仿(CDCl_3)与氘代三氟乙酸(TFA-d) (体积比为 6/1) 混合溶剂溶解样品.

1.4.2 聚集体形貌表征

通过扫描电镜(SEM, 日本 Hitachi, S4800)、原子力显微镜(AFM, 韩国 Park Systems, XE 100)和透射电镜(TEM, 日本 JEOL, JEM-1400)观察聚集体形貌. 扫描电镜样品是将 5 μL 的聚集体水溶液滴在硅片上. 在观察之前, 样品用铂金溅射, 样品在室温下干燥. 透射电镜样品是将 5 μL 的聚集体水溶液滴在涂覆有碳网的铜网上, 样品在室温下干燥. 原子力显微镜样品是将 5 μL 的聚集体水溶液滴在硅片上, 样品在室温下干燥.

1.4.3 聚集体结构表征

圆二色谱(CD)使用 JASCO J1500 光谱仪在室温下对聚集体水溶液进行分析. 样品浓度为 0.02 g/L, 石英池光路长度为 1 cm. 分析波长介于 200~400 nm 之间, 积分时间为 1 s, 波长步长为 0.2 nm.

广角 X 射线衍射(WAXS)使用上海同步辐射光源 BL16B1 线站对经过冷冻干燥后的聚集体粉末进行 WAXS 表征. 测试时 X 射线曝光时间为 60 s. 利用 SGTtools 软件进行数据处理.

1.5 聚合物表征结果

用 $^1\text{H-NMR}$ 对合成的 PBLG 进行表征. 如图 3 所示, $\delta=4.60$ (1) 的峰为 PBLG 主链中次甲基($-\text{CH}-$)的质子信号峰, $\delta=1.91$ (2) 和 $\delta=2.44$ (3) 的峰分别为 PBLG 侧链中 β 与 γ 位亚甲基($-\text{CH}_2-$)的质子信号峰, $\delta=5.09$ (4) 的峰为 PBLG 侧链苄基中亚甲基($\text{ph}-\text{CH}_2-$)的质子信号峰, $\delta=7.28$ (5) 的峰为侧链苯环的质子信号峰. 图 3 中相应峰的编号与其化学结构的关键基团对应, 表明 PBLG 均聚物的成功合成. 图中相应信号峰积分面积比进一步表明 PBLG 的成功合成.

用 GPC 对 PBLG 的分子量及其分布进行测试

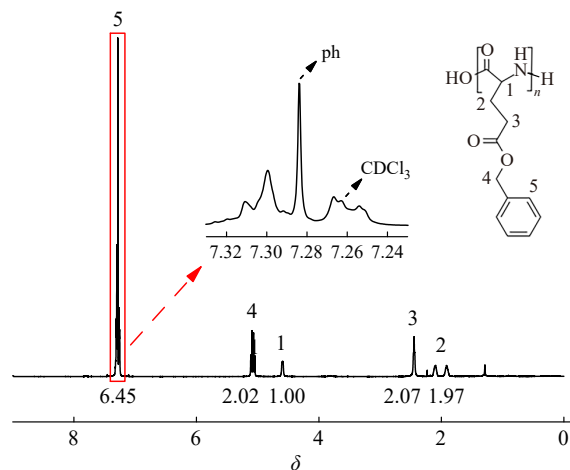


Fig. 3 $^1\text{H-NMR}$ spectrum of PBLG homopolymers.

表征, 进而得到数均分子量(M_n)及其分散性指数(D). PBLG 均聚物的 GPC 曲线(图 4)呈现出较窄的对称单峰, 说明聚合物分子量分布较窄. GPC 表征结果表明, 所合成 PBLG 的 M_n 为 125 kg/mol, D 为 1.30, 聚合度为 570. 因此, 以 PBLG₅₇₀ 表示该聚合物.

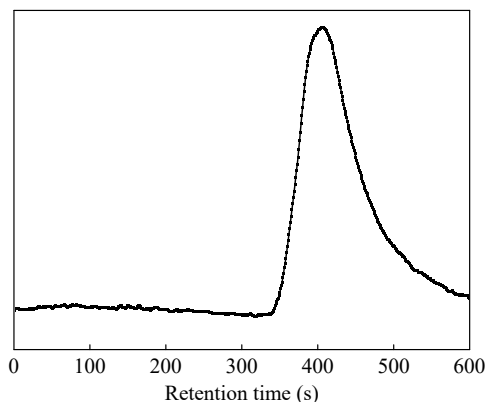


Fig. 4 GPC trace of PBLG₅₇₀ homopolymers.

2 结果与讨论

2.1 溶液自组装与微流控自组装的对比

对比相同组装条件下均聚物 PBLG₅₇₀ 通过溶液自组装和微流控自组装两种方式所形成的聚集体结构. 图 5(a) 和 5(b) 分别为溶液自组装得到的聚集体 SEM 和 TEM 图像. 由图可见, PBLG₅₇₀ 自组装形成尺寸较均一的棒状聚集体. 经统计, 其长度为 (143 ± 33) nm, 宽度为 (68 ± 9) nm. 微流控自组装后所形成的聚集体 SEM、TEM 和 AFM 图像分别在图 5(c)、5(d) 和 5(e) 中给出. 与溶液自组装结果相比, PBLG₅₇₀ 在微流控通道中自组装形成

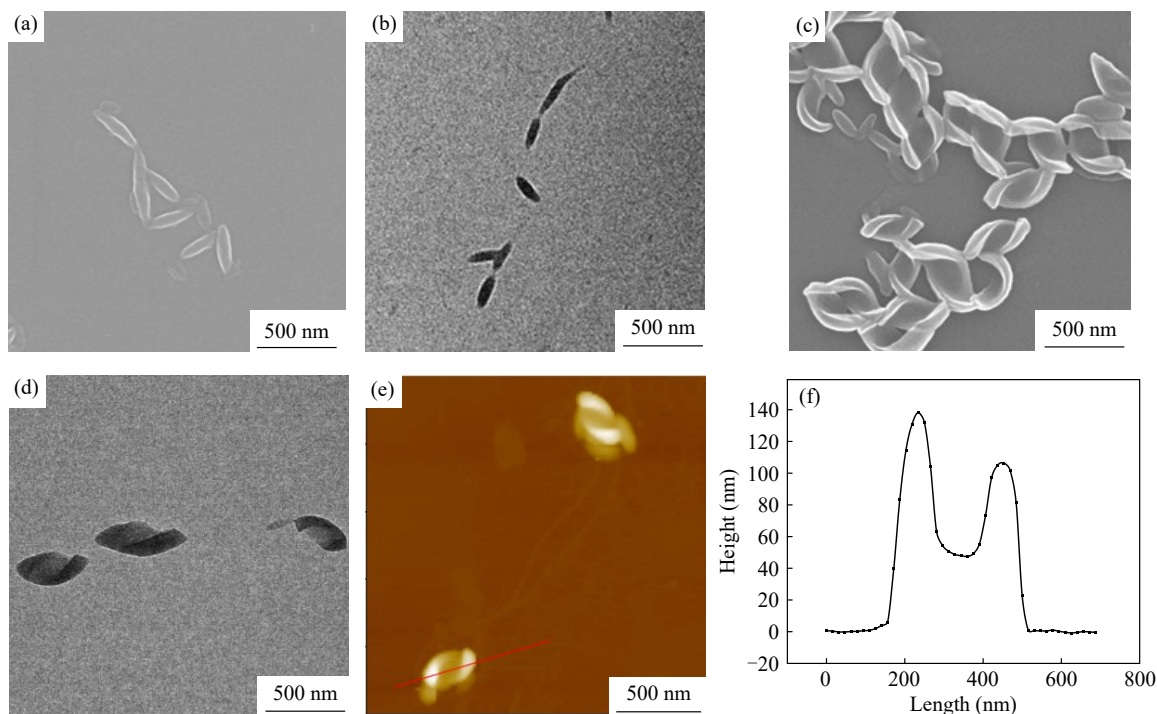


Fig. 5 SEM (a) and TEM (b) images of rodlike aggregates formed through solution self-assembly of PBLG₅₇₀; SEM (c), TEM (d), and AFM (e) images of twisted aggregates formed through microfluidic self-assembly of PBLG₅₇₀; (f) The height profile of the twisted aggregate along the red line in (e).

了尺寸均一的扭曲状聚集体, 其长度为 (414 ± 55) nm, 宽度为 (225 ± 27) nm. 图 5(f)所示为图 5(e)的 AFM 图像红线区域高度轮廓. 结果表明, 聚集体结构存在中间凹陷、两端扭曲的形态, 中间与两端的高度差在 60~80 nm 之间.

溶液自组装与微流控自组装所形成的聚集体在尺寸和形貌上都存在显著不同. 通过对比实验装置(图 6)发现, 在溶液自组装中, 水是滴入聚合物溶液, 而在微流控自组装, 水和聚合物溶液是在微流控通道中交叉流动, 在通道内混合. 在流体相互运动的过程中, 相邻两流体层间会产生剪切力. 为了探究剪切力对微流控自组装过程的影响, 进行了调控总流速和流速比等改变流体运动的实验. 其中, 总流速为聚合物溶液的流速与

水的流速之和, 流速比定义为聚合物溶液的流速与水的流速之比. 图 7(a)~7(d)为 4 组代表性总流速和流速比条件下所形成的聚集体形貌. 通过总结实验数据, 绘制了不同总流速和流速比下的聚集体形貌相图(图 7(e)), 相图中圆圈和三角形分别表示扭曲状聚集体和尺寸相对较小的棒状聚集体. 在总流速较低, 低流速比的情况下, 例如总流速为 15 mL/h, 流速比为 1.0 时(图 7(c)), 均聚物 PBLG₅₇₀ 形成扭曲状聚集体. 而在总流速较高, 高流速比的情况下, 例如总流速为 15 mL/h, 流速比为 5.6 (图 7(d)), 形成尺寸较小的棒状聚集体.

在层流中, 总流速和流速比增加, 相邻流体层之间的流速差越大, 流体层间的剪切作用也越

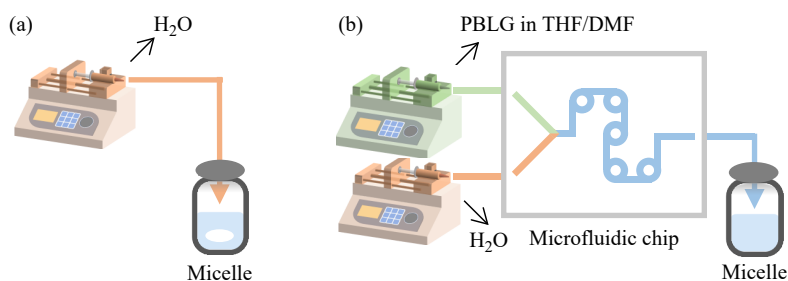


Fig. 6 Schematic diagrams of (a) solution self-assembly and (b) microfluidic self-assembly.

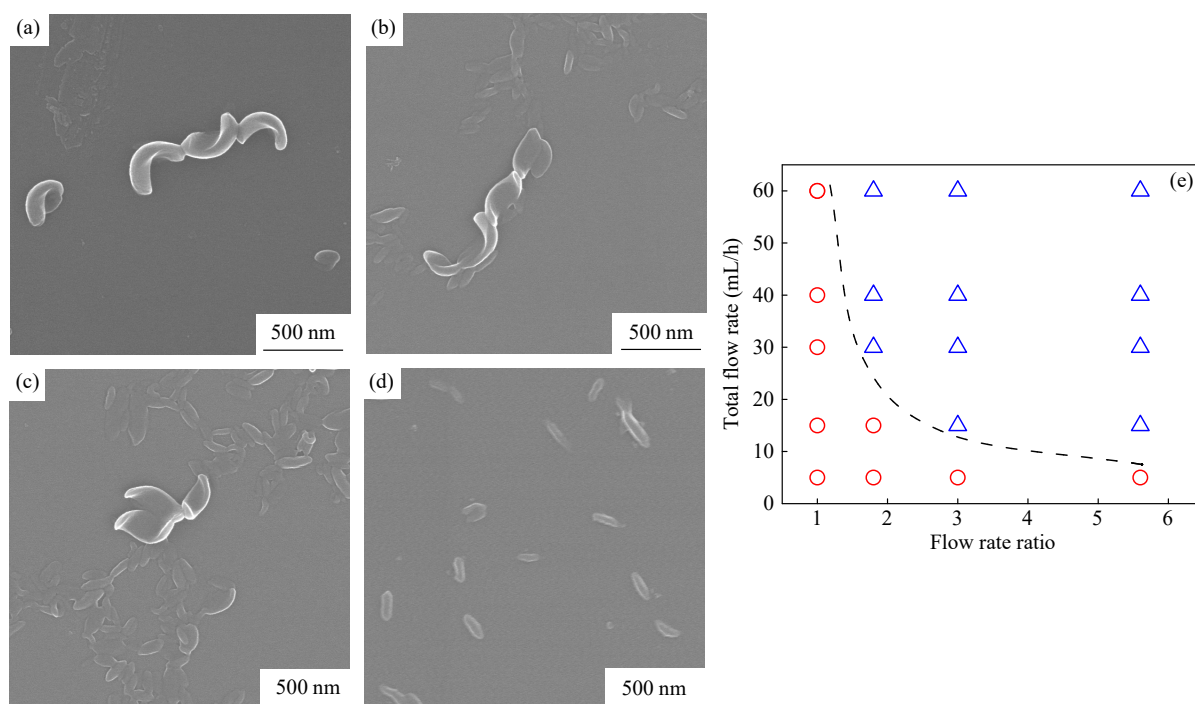


Fig. 7 SEM images (a–d) and morphological diagram (e) of the PBLG₅₇₀ aggregates formed by different total flow rates and flow rate ratios under microfluidic self-assembly. (a) 15 mL/h, 1.0, (b) 30 mL/h, 1.0, (c) 60 mL/h, 1.0, (d) 15 mL/h, at the flow rate ratio of 5.6. The circles represent the twisted aggregates, the triangles represent the rodlike aggregate in (e).

大. 有研究证明, 剪切场可诱导聚合物纳米粒子的聚集和破裂^[19,21,22,29–32]. 在低剪切速率下, 剪切力引起的聚集占主导地位, 因为剪切力既增加了粒子碰撞的概率, 又提供了克服粒子间排斥力的能量^[20]. 随着剪切速率的提高, 剪切作用超过粒子聚集作用, 发生剪切诱导的破裂^[29]. 因此, 形成扭曲状聚集体的关键在于低剪切速率下剪切聚集作用, 这也是相同条件下溶液自组装和微流控自组装形成的聚集体形貌存在差异的原因.

此外, 我们曾尝试利用T型微流控通道开展聚肽自组装研究. 在相同的组装条件下, T型微流控通道中形成的形貌不均一, 观察到棒状和扭曲状聚集体的共存状态. 这一差异与聚合物溶液与选择性溶剂(水)之间的混合效率有关. 在T型微流控通道中, 其界面区域相对较小, 混合效率较低. 而在环型微流控通道中, 入口通道为Y型, 两相流体之间的对流效应增强, 且环状通道实现了连续分流与汇合, 大幅增加了流体间的混合效率, 最终得到了均一的扭曲状聚集体.

2.2 形成机理

2.2.1 动力学过程

首先, 在微流控自组装中, 以不同含水量制备PBLG₅₇₀的聚集体(图8(a)). 图8(b)~8(d)是在微

流控通道中、不同含水量下的聚集体SEM图, 插图为其TEM图. 在15%含水量下, PBLG₅₇₀组装形成实心棒状聚集体(图8(b)), 随着含水量增加至25%, 形成带有凹陷的棒状聚集体(图8(c)). 当含水量进一步增加至35%, 形成扭曲状聚集体(图8(d)). 根据扫描电子显微镜图像估算, 带有凹陷的棒状聚集体的长度和宽度分别为475和225 nm. 而扭曲状聚集体的长度和宽度分别约为414和237 nm. 由此可知, 扭曲状聚集体的形成经历从棒状聚集体到带有凹陷的棒状聚集体, 再到扭曲状聚集体的演化过程.

为了验证该过程, 设计了两步组装实验. 即第一步, 进行微流控自组装制备尺寸较大的实心棒状聚集体溶液; 第二步, 在上一步所制备的棒状聚集体溶液中采用常规方式加水至不同水量(图8(e)). 结果表明, 在第二步组装实验中, 滴加10%含水量时, 棒状聚集体开始产生凹陷(图8(f)); 20%含水量时, 凹陷进一步增大(图8(g)); 35%含水量时, 形成扭曲状聚集体(图8(h)). 由此可见, 随着第二步组装实验的水量增加, 发生从棒状聚集体, 到带有凹陷的棒状聚集体, 再到扭曲状聚集体的形貌转变. 这进一步证明扭曲状聚集体是由棒状聚集体演化而来的. 而含水量是棒状

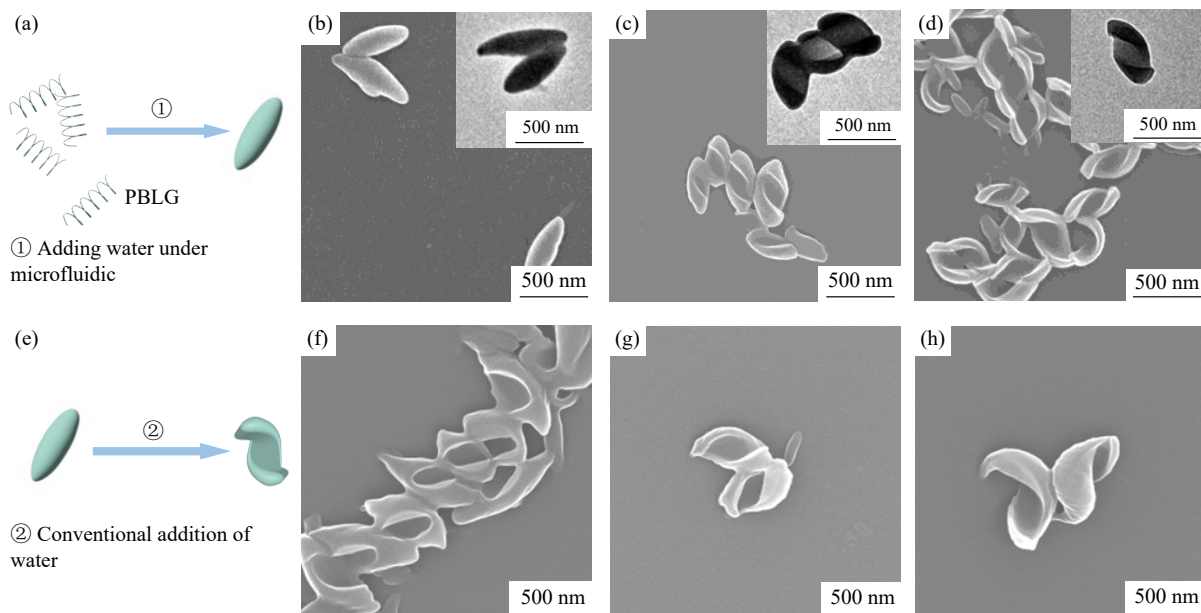


Fig. 8 Morphological evolution of the PBLG₅₇₀ aggregates under microfluidic self-assembly (a–d) and two-step self-assembly (e–h). (b–d) SEM images of the PBLG₅₇₀ aggregates under the conditions of various water contents for microfluidic self-assembly: (b) 15%, (c) 25%, (d) 35%. Insets are the corresponding TEM images. (f–h) SEM images of the PBLG₅₇₀ aggregates after adding various water contents in the two-step self-assembly: (f) 10%, (g) 20%, (h) 35%.

聚集体演化成扭曲状聚集体的关键。值得注意的是,微流控所形成的扭曲状聚集体比两步组装法制备的聚集体尺寸更均一,这是因为微流控通道提供了稳定的剪切作用和均匀的混合环境。

基于以上实验结果,微流控通道中扭曲状聚集体的形成过程可分为两个阶段。在第一阶段中,在低剪切速率下剪切力提供PBLG链之间碰撞的可能,PBLG₅₇₀聚集形成尺寸较大的实心棒状聚集体。这是形成扭曲状聚集体的前提。在第二阶段中,随着含水量的增加,聚集体内部结构发生调整,棒状聚集体开始产生凹陷。而随着含水量的进一步增加,有凹陷的棒状聚集体内部结构进一步调整,形成扭曲状聚集体。

2.2.2 构象和分子排列机制

PBLG在不同含水量下,存在多变的构象,如 α -螺旋,PPII-螺旋等^[33]。根据上述扭曲状聚集体的演化过程,以此推测,PBLG的构象以及PBLG链之间的排列在形貌演化过程中起着重要作用。为此,对微流控自组装中不同含水量条件下制备的聚集体进行了CD和WAXS测试。

图9所示为微流控自组装中不同含水量下所获得的聚集体水溶液的CD光谱表征结果。如图所示,所有CD谱线在209 nm处都有一个负峰。在15%含水量下,222 nm附近的峰为负峰,表明

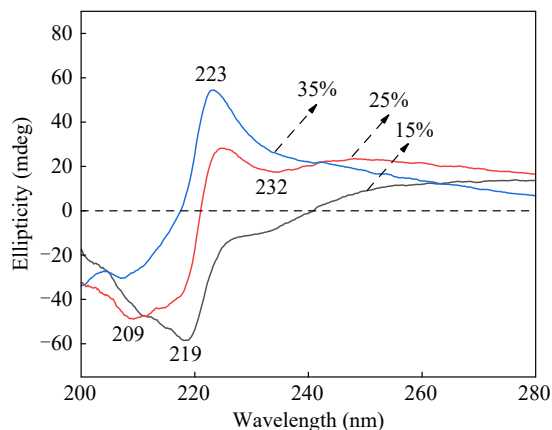


Fig. 9 CD spectra of the PBLG₅₇₀ aggregates formed under the microfluidic self-assembly at various water contents.

PBLG主链采取 α -螺旋构象。随着含水量增加至25%含水量,219 nm处的负峰分为一个正峰(223 nm处)和一个负峰(232 nm处)。而223 nm处的正峰是表明形成PPII-螺旋的重要信号^[33]。随着含水量进一步增加至35%含水量,221 nm处的正峰强度进一步增强,表明PPII-螺旋构象的含量提高。PPII-螺旋是一种延伸的左旋螺旋构象。其中,支撑 α -螺旋构象的氢键作用方式在PPII-螺旋中变得不规则。因而,与 α -螺旋构象相比,PPII-螺旋的出现频次较低、需要一定条件才可形成,例如本研究所采用的微流控通道中的剪切

环境。此外, CD 的峰值位置随含水量增加发生偏移, 这是由于 α -螺旋构象向 PPII-螺旋构象转变而导致的。

图 10 所示为微流控自组装中 25% 和 35% 含水量下所获得的聚集体粉末样品的 WAXS 表征结果。两个含水量下所获得的形貌分别是带有凹陷的棒状聚集体和扭曲状聚集体, 它们的 WAXS 表征结果在出峰位置和强度方面有着明显差别。25% 含水量下的带有凹陷的棒状聚集体, 出峰位置在 $q_1=4.32 \text{ nm}^{-1}$, 而 35% 含水量下的扭曲状聚集体, 其出峰位置在 $q_2=4.65 \text{ nm}^{-1}$ 。在 $4\sim 5 \text{ nm}^{-1}$ 间的衍射峰, 证实了 PBLG 在上述聚集体内部存在有序排列^[34~36]。根据布拉格定律计算上述衍射峰所对应的空间距离可知, 在带有凹陷的聚集体和扭曲状聚集体内部, 相邻 PBLG 链段间的距离分别为 1.45 和 1.35 nm。这说明 PBLG₅₇₀ 在扭曲状聚集体

中排列比在带有凹陷的棒状聚集体结构更加紧密。这种在扭曲状聚集体中更加紧密的链段排列方式, 使聚集体内部产生了内扭力, 促使聚集体扭曲行为的发生。

综上所述, 在微流控通道中选择性溶剂(水)的混入和剪切作用下, 聚肽链间距减小、链有序排列更紧密, 同时其 α -螺旋构象向 PPII-螺旋构象转变, 这使聚集体产生内扭力, 因而在剪切条件下发生形貌转变, 形成扭曲状聚集体形貌。

此外, 我们注意到 PBLG₅₇₀ 扭曲状聚集体的扭转方向呈现左手性。采用与 PBDG₅₇₀ 分子量相近但手性相反的均聚物 PBDG₅₂₄, 在相同微流控条件下, PBDG₅₂₄ 均聚物可以形成右手性的扭曲状聚集体。不同手性 PBLG 和 PBDG 的微流控自组装机制, 特别是手性对扭转方向的影响, 是值得进一步探究的课题。

3 结论

通过在环型微流控通道对 PBLG 的自组装行为进行调控, 获得了形貌独特的扭曲状聚集体结构。通过 CD 和 WAXS 等手段, 揭示了微流控自组装中扭曲状结构的形成机理。在选择性溶剂(水)的剪切作用下, PBLG 聚肽的链间距减小、链有序排列更紧密, 同时其 α -螺旋构象向 PPII-螺旋构象转变, 这使聚集体产生内扭力, 驱动棒状聚集体向带有凹陷的棒状聚集体、扭曲状聚集体发生形貌转变。该研究结果为微流控装置中复杂形貌纳米结构的构建, 提供了深刻的机制理解和参考。

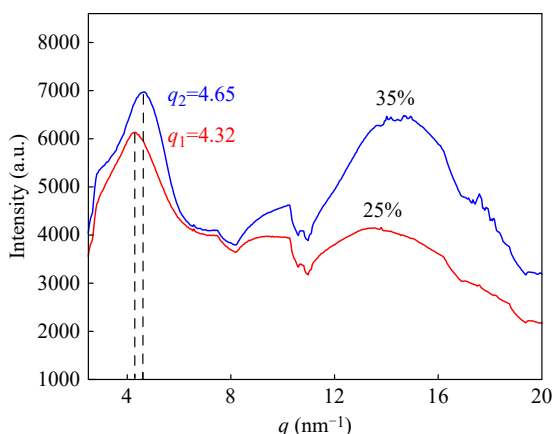


Fig. 10 WAXS patterns of PBLG aggregates formed under microfluidic self-assembly at various water contents.

REFERENCES

- 1 Cai, C. H.; Lin, J. P. Recent advances in the solution self-assembly of polypeptides. *J. Polym. Sci.*, **2024**, 62(4), 693–706.
- 2 Cai, C. H.; Lin, J. P.; Lu, Y. Q.; Zhang, Q.; Wang, L. Q. Polypeptide self-assemblies: nanostructures and bioapplications. *Chem. Soc. Rev.*, **2016**, 45(21), 5985–6012.
- 3 Yang, C. Y.; Gao, L.; Lin, J. P.; Wang, L. Q.; Cai, C. H.; Wei, Y. H.; Li, Z. B. Toroid formation through a supramolecular "cyclization reaction" of rodlike micelles. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2017**, 56(20), 5546–5550.
- 4 任许乐, 蔡春华, 林嘉平. 聚肽三嵌段共聚物棒状胶束的超分子环化行为研究. *高分子学报*, **2024**, 55(12), 1669–1679.
- 5 Zhu, J. H.; Zhang, S. Y.; Zhang, K.; Wang, X. J.; Mays, J. W.; Wooley, K. L.; Pochan, D. J. Disk-cylinder and disk-sphere nanoparticles via a block copolymer blend solution construction. *Nat. Commun.*, **2013**, 4, 2297.
- 6 Xu, W. H.; Xu, Z. W.; Cai, C. H.; Lin, J. P.; Gao, L.; Qi, H. M.; Lin, S. L. Spiral- and meridian-patterned spheres self-assembled from block copolymer/homopolymer binary systems. *Nanoscale*, **2021**, 13(33), 14016–14022.
- 7 王寅超, 郑家豪, 张伟安, 蔡春华, 林嘉平. 含卟啉聚肽的合成及其自组装行为研究. *高分子学报*, **2024**, 55(2), 172–181.

- 8 Duan, W. H.; Ji, S. F.; Guan, Y.; Mu, X.; Fang, S.; Lu, Y. X.; Zhou, X. F.; Sun, J.; Li, Z. B. Esterase-responsive polypeptide vesicles as fast-response and sustained-release nanocompartments for fibroblast-exempt drug delivery. *Biomacromolecules*, **2020**, 21(12), 5093–5103.
- 9 Gu, P. F.; Xu, H.; Sui, B. W.; Gou, J. X.; Meng, L. K.; Sun, F.; Wang, X. J.; Qi, N.; Zhang, Y.; He, H. B.; Tang, X. Polymeric micelles based on poly(ethylene glycol) block poly(racemic amino acids) hybrid polypeptides: conformation-facilitated drug-loading behavior and potential application as effective anticancer drug carriers. *Int. J. Nanomedicine*, **2012**, 7, 109–122.
- 10 Naser, N. Y.; Wixson, W. C.; Larson, H.; Cossairt, B. M.; Pozzo, L. D.; Baneyx, F. Biomimetic mineralization of positively charged silica nanoparticles templated by thermoresponsive protein micelles: applications to electrostatic assembly of hierarchical and composite superstructures. *Soft Matter*, **2025**, 21(2), 166–178.
- 11 Zhao, W.; Li, Z. X.; Liang, N.; Liu, J. Y.; Yan, P. F.; Sun, S. P. AIE-featured redox-sensitive micelles for bioimaging and efficient anticancer drug delivery. *Int. J. Mol. Sci.*, **2022**, 23(18), 10801.
- 12 Xue, J. X.; Guan, Z.; Lin, J. P.; Cai, C. H.; Zhang, W. J.; Jiang, X. Q. Cellular internalization of rod-like nanoparticles with various surface patterns: novel entry pathway and controllable uptake capacity. *Small*, **2017**, 13(24), 2017, 13, 1604214.
- 13 Hu, R.; Cai, C. H.; Lin, J. P.; Gao, L. Chirality of superhelices self-assembled from polypeptide mixtures. *Macromolecules*, **2022**, 55(11), 4297–4304.
- 14 Patel, B. B.; Pan, T.; Chang, Y.; Walsh, D. J.; Kwok, J. J.; Park, K. S.; Patel, K.; Guirionnet, D.; Sing, C. E.; Diao, Y. Concentration-driven self-assembly of PS-b-PLA bottlebrush diblock copolymers in solution. *ACS Polym. Au*, **2022**, 2(4), 232–244.
- 15 Wen, S. P.; Fielding, L. A. Pyridine-functional diblock copolymer nanoparticles synthesized via RAFT-mediated polymerization-induced self-assembly: effect of solution pH. *Soft Matter*, **2022**, 18(7), 1385–1394.
- 16 Yao, Y. K.; Gao, L.; Cai, C. H.; Lin, J. P.; Lin, S. L. Supramolecular polymerization of polymeric nanorods mediated by block copolymers. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2023**, 62(9), e202216872.
- 17 Fielden, S. D. P. Kinetically controlled and nonequilibrium assembly of block copolymers in solution. *J. Am. Chem. Soc.*, **2024**, 146(28), 18781–18796.
- 18 Numata, M. Kinetically controlled supramolecular structures created in nonequilibrium microflow spaces. *Kinetic Control in Synthesis and Self-Assembly*. Amsterdam: Elsevier, **2019**, 249–267.
- 19 Nikoubashman, A. Self-assembly of colloidal micelles in microfluidic channels. *Soft Matter*, **2017**, 13(1), 222–229.
- 20 Tan, Z. P.; Lan, W.; Hou, Z. Y.; Wang, K.; Li, Y. C.; Xu, J. P.; Luo, X. B.; Zhang, L. B.; Zhu, J. T. Flow-induced micellar morphological transformation in microfluidic chips under nonequilibrium state: from aggregates to spherical micelles. *Langmuir*, **2020**, 36(19), 5377–5384.
- 21 Wang, C. W.; Sinton, D.; Moffitt, M. G. Flow-directed block copolymer micelle morphologies via microfluidic self-assembly. *J. Am. Chem. Soc.*, **2011**, 133(46), 18853–18864.
- 22 Wang, C. W.; Sinton, D.; Moffitt, M. G. Morphological control via chemical and shear forces in block copolymer self-assembly in the lab-on-chip. *ACS Nano*, **2013**, 7(2), 1424–1436.
- 23 Tan, Z. P.; Hou, Z. Y.; Wang, K.; Li, Y. C.; Zhang, L. B.; Zhu, J. T.; Xu, J. P. Kinetic control of length and morphology of segmented polymeric nanofibers in microfluidic chips. *Langmuir*, **2020**, 36(44), 13364–13370.
- 24 Oh, S. Y.; Lee, C. S. Comparison and analysis of mixing efficiency in various micromixer designs. *Korean J. Chem. Eng.*, **2024**, 41(8), 2449–2458.
- 25 Ripoll, M.; Martin, E.; Enot, M.; Robbe, O.; Rapisarda, C.; Nicolai, M. C.; Deliot, A.; Tabeling, P.; Authelin, J. R.; Nakach, M.; Wils, P. Optimal self-assembly of lipid nanoparticles (LNP) in a ring micromixer. *Sci. Rep.*, **2022**, 12, 9483.
- 26 Wang, X.; Liu, Z. Q.; Wang, B.; Cai, Y. K.; Song, Q. H. An overview on state-of-art of micromixer designs, characteristics and applications. *Anal. Chim. Acta*, **2023**, 1279, 341685.
- 27 López, R. R.; Ocampo, I.; Sánchez, L. M.; Alazzam, A.; Bergeron, K. F.; Camacho-León, S.; Mounier, C.; Stiharu, I.; Nerguizian, V. Surface response based modeling of liposome characteristics in a periodic disturbance mixer. *Micromachines*, **2020**, 11(3), 235.
- 28 Lee, J. S.; Lee, M. G.; Jung, C.; Park, Y. H.; Song, C.; Choi, M. C.; Park, H. G.; Park, J. K. High-throughput nanoscale lipid vesicle synthesis in a semicircular contraction-expansion array microchannel. *BioChip J.*, **2013**, 7(3), 210–217.
- 29 Koide, Y.; Goto, S. Effect of scission on alignment of nonionic surfactant micelles under shear flow. *Soft Matter*, **2023**, 19(23), 4323–4332.
- 30 Liu, S. Y.; Sureshkumar, R. Deformation, rupture, and morphology hysteresis of copolymer nanovesicles in uniform shear flow. *Langmuir*, **2025**, 41(8), 5083–5096.

- 31 Prhashanna, A.; Khan, S. A.; Chen, S. B. Micelle morphology and chain conformation of triblock copolymers under shear: LA-DPD study. *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Aspects*, **2016**, 506, 457–466.
- 32 Zhou, Y.; Zhou, C.; He, X.; Xue, X. G.; Qian, W.; Luo, S. K.; Xia, H. G. Shear-induced self-assembly of linear ABC triblock copolymers in solution: Creation of 1D cylindrical micellar structures. *RSC Adv.*, **2016**, 6(7), 5711–5717.
- 33 Liu, Z.; Shi, X. J.; Shu, W. C.; Qi, S.; Wang, X. S.; He, X. H. The effect of hydration and dehydration on the conformation, assembling behavior and photoluminescence of PBLG. *Soft Matter*, **2022**, 18(23), 4396–4401.
- 34 Haataja, J. S.; Houbenov, N.; Iatrou, H.; Hadjichristidis, N.; Karatzas, A.; Faul, C. F. J.; Rannou, P.; Ikkala, O. Double smectic self-assembly in block copolypeptide complexes. *Biomacromolecules*, **2012**, 13(11), 3572–3580.
- 35 Presa-Soto, D.; Carriedo, G. A.; de la Campa, R.; Presa Soto, A. Formation and reversible morphological transition of bicontinuous nanospheres and toroidal micelles by the self-assembly of a crystalline-b-coil diblock copolymer. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2016**, 55(34), 10102–10107.
- 36 Lee, Y. H.; Yang, Y. L.; Yen, W. C.; Su, W. F.; Dai, C. A. Solution self-assembly and phase transformations of form II crystals in nanoconfined poly(3-hexyl thiophene) based rod-coil block copolymers. *Nanoscale*, **2014**, 6(4), 2194.

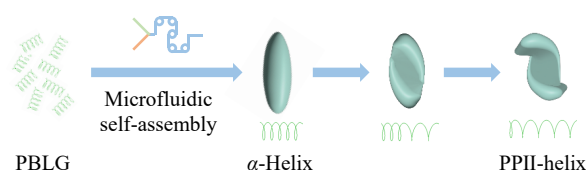
Research Article

Self-assembly Behavior of Polypeptides under Microfluidic Shear Condition

Qian-qing Li, Liang Gao*, Jia-ping Lin*, Chun-hua Cai

(School of Materials Science and Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237)

Abstract The unique shear environment in microfluidic channels offers new opportunities for constructing complex nanostructures. In this study, a ring-shaped microfluidic channel was designed to utilize shear forces to induce rigid polypeptides for forming twisted aggregates that are different from those formed by solution self-assembly. By examining the effects of shear rate and water content, and combining circular dichroism (CD) and synchrotron wide-angle X-ray scattering (WAXS) tests, the formation mechanism of twisted aggregate of poly(γ -benzyl-L-glutamate) (PBLG) was revealed. Under the shear of a selective solvent (water), the distance between polypeptide chains decreases, and the chain arrangement becomes more ordered and compact. Meanwhile, the α -helix conformation of the polypeptide transforms into PPII-helix conformation, which generates an internal twisted force in the aggregates, forming a novel twisted aggregate morphology. The research results can provide a new strategy for the directed design of hierarchical structures.



Keywords Microfluidic, Shear, Polypeptide self-assembly, Twisted aggregates

* Corresponding authors: Liang Gao, E-mail: lianggao@ecust.edu.cn

Jia-ping Lin, E-mail: jlin@ecust.edu.cn