

05

Оценка влияния концентрации акриламида на диффузию биомолекул в геле

© А.Н. Зубик, А.Л. Буляница, Г.Е. Рудницкая, А.А. Евстапов

Институт аналитического приборостроения РАН,
198095 Санкт-Петербург, Россия
e-mail: tunix@yandex.ru

Поступило в Редакцию 28 февраля 2024 г.

В окончательной редакции 7 июня 2024 г.

Принято к публикации 23 июня 2024 г.

При количественном определении целевых молекул ДНК высокоточным методом является проведение реакции амплификации в тонком слое полиакриламидного геля. Гель затрудняет диффузию молекул ДНК, что приводит к концентрированию продуктов амплификации (ампликонов) вокруг исходной молекулы-мишени и формированию молекулярных колоний. Повышение концентрации акриламида позволяет получить более плотные гели, что позволяет уменьшить размер колоний. Уменьшение размера колоний при сохранении эффективной площади геля позволяет регистрировать большее количество колоний, увеличивая динамический диапазон метода. Для исследования влияния концентрации акриламида на диффузию ампликонов (фрагментов ДНК, получаемых в результате анализа) в геле использовали простой метод оценки коэффициента диффузии на основе регистрации движущихся границ флуоресцентно меченых биомолекул. Экспериментальная оценка влияния концентрации акриламида на диффузию синтетических олигонуклеотидов и ампликонов в геле показала, что при увеличении концентрации акриламида с 7 до 10% оценочные значения коэффициента диффузии меняются примерно в 2 раза.

Ключевые слова: микрофлюидный чип, полиакриламидный гель, коэффициент диффузии, ампликон.

DOI: 10.61011/JTF.2024.09.58675.56-24

Введение

Микрофлюидные чипы нашли широкое применение в устройствах для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР). Одним из вариантов их использования является реализация метода ПЦР в тонком слое полиакриламидного геля, расположенного в реакционной камере микрофлюидного чипа, что обеспечивает ряд преимуществ над жидкостным вариантом [1–4]. В микрофлюидном чипе тонкий слой полиакриламидного геля используется в качестве интегрированной функциональной структуры — среды для проведения ПЦР по методу молекулярных колоний (ММК). При проведении реакции амплификации ДНК (например, ПЦР) в тонком слое полиакриламидного геля [1] структура геля фиксирует длинные макромолекулы-мишени ДНК пробы, но не влияет на диффузию компонентов реакции. При относительно малых концентрациях молекул-мишеней, последние располагаются на существенном (по сравнению с размерами молекул) расстоянии друг от друга. Продукты реакции (ампликоны) накапливаются вокруг исходной ДНК в виде колонии. Счет колоний, которые пространственно разделены в геле, позволяет реализовать прямой количественный анализ.

Очевидно, что максимальное число регистрируемых колоний ограничено площадью геля в реакционной камере. В случае перекрытия или слияния колоний количественный анализ становится невозможным. Умень-

шение размера колоний при сохранении площади геля повышает количество „вмещаемых“ колоний, что увеличивает динамический диапазон метода и уменьшает вероятность перекрытия колоний. Известно, что при увеличении концентрации акриламида в геле, например, с 6 до 15%, средний радиус колоний может изменяться с 300 до 50 μm (для ампликонов длиной 234 пар нуклеотидов) [2]. Для использования тонкослойных гелей в качестве функциональных структур микрофлюидных чипов следует задавать топологию и геометрические параметры реакционной камеры и знать характеристики гелевого слоя. С этой целью в настоящей работе проведено исследование влияния концентрации акриламида на диффузию ампликонов (фрагментов ДНК) в полиакриламидном геле.

Гель — дисперсная система, состоящая из жидкой дисперсионной среды и высокомолекулярной дисперсной фазы, которая образует пространственную пористую структуру. Однако неправильно было бы считать гель регулярной пространственной решеткой с жесткими ячейками определенного среднего размера. При небольшом количестве сшивающего агента гель представляет собой скорее длинные нити (волокна), заполняющие весь объем и лишь в отдельных точках случайным образом сшитые между собой. Такая система не является жесткой. Мигрирующие в геле макромолекулы могут раздвигать гибкие длинные участки линейных полимеров акриламида, на что расходуется энергия, таким

образом, миграция молекул замедляется и происходит своеобразное „трение“ их о гель [5]. Чем больше содержание акриламида, тем гуще нити полимера, меньше промежутки между ними и сильнее трение.

Задача оценки коэффициентов диффузии различных веществ в гелях является актуальной, например, для практических целей создания биореакторов на основе гелей [6]. Гидрогели биосовместимы, а также структурно и по составу сходны с внеклеточным матриксом, поэтому разрабатываются методики тканевой инженерии с применением микрогелевых капель для создания искусственных тканей [7,8]. В существующих моделях применяются сложные алгоритмы расчетов, а в качестве объектов исследования используют неорганические вещества (индикаторы, красители) и компоненты растворов, необходимые для роста клеток [9]. В настоящей работе исследуется влияние концентрации акриламида на диффузию биомолекул, представляющих собой фрагменты ДНК разной длины. Для этого предлагается использовать простой способ оценки диффузии.

1. Объекты и методы исследования

Для оценки влияния концентрации акриламида на диффузию ампликонов в геле использовались полиакриламидные гели, получаемые сополимеризацией акриламида (АА) и бис-акриламида (МБА, N,N'-метиленабисакриламид) в присутствии инициатора полимеризации (персульфат аммония) и катализатора. Для получения гелей разной плотности использовали две концентрации акриламида — 7 и 10% (w/w). Далее в работе эти гели обозначены как 7%-й и 10%-й гель соответственно. Так как структура геля может изменяться со временем [10], для экспериментальных исследований использовались свежеприготовленные гели.

Так как полиакриламидный гель представляет собой оптически прозрачную среду, для экспериментальной оценки диффузии можно использовать так называемый метод движущихся границ, когда оценивается скорость продвижения вглубь полимерной матрицы фронта (границы, плоскости) окрашенного диффузанта с постоянной концентрацией [11]. На начальном этапе для предварительной оценки диффузионных свойств гелей разной плотности в качестве переносимого вещества был взят раствор красителя (черные чернила на водной основе). На готовые образцы гелей наносили раствор красителя, затем образцы герметизировали и хранили вертикально при комнатной температуре. Движение фронта красителя в вертикальном направлении (вверх или вниз) в гелях разной концентрации регистрировали в течение 5 мин после нанесения красителя и периодически повторяли измерения в течение двух суток. Диффузионное расстояние оценивали, используя оцифрованные фотографии образцов с изображением границы фронта красителя в геле.

Достоинствами используемой методики являются простота, наглядность, отсутствие необходимости в специализированном оборудовании или разрушении образца, к недостаткам можно отнести невысокую точность. В отличие от схожей методики, применяемой в работе [10], когда закрытые с верхнего торца капилляры с гелями на основе соли кремниевой кислоты погружали нижней частью в раствор контрастного красителя, в нашем случае на гелевые цилиндры наносили фиксированный объем красителя, после чего систему гель-краситель герметизировали. Это обусловлено желанием в дальнейшем предотвратить или уменьшить загрязнение рабочих поверхностей при работе с растворами ампликонов. В этом случае объем вводимого аналита является конечным, поэтому наблюдаемые процессы могут не в полной мере соответствовать кинетике перемещения изоконцентрационных плоскостей, которая предполагается в методе движущихся границ.

Для оценки влияния концентрации акриламида на диффузию ампликонов в экспериментальных исследованиях использовали фрагменты ДНК, меченные флуоресцентным красителем. Ампликоны длиной 103 пары нуклеотидов (п.н.) получали при проведении ПЦР-РВ в присутствии красителя SYBR Green I (набор реагентов М-427 ООО Синтол, Россия) и специфичных праймеров (ООО ДНК-Синтез, Россия). Реакцию проводили на приборе АНК-32 (ИАП РАН, Россия), в качестве ДНК-мишени использовали синтезированные фрагменты кДНК цитокератина-19 известной концентрации. Также в работе использовались короткие синтезированные одноцепочечные фрагменты ДНК длиной 27 нуклеотидов с красителем FAM (ООО Синтол, Россия).

Для оценки диффузионного перемещения меченых флуоресцентным красителем фрагментов ДНК образцы с гелем готовили в стеклянных капиллярах (см. рисунок) с внутренним диаметром ~ 3 мм в два этапа: на нижний свежеприготовленный слой геля наслаивали полимеризующийся гель, содержащий меченые фрагменты ДНК.

Движение фронта меченых фрагментов ДНК в нижний слой геля регистрировали на прототипе флуоресцентного детектора ДМК-1 (ИАП РАН, Россия), с длиной волны лазерного источника возбуждения 473 nm. По изменению интенсивности флуоресценции вдоль оси капилляра определяли границу фронта, пороговое значение считали на уровне 5% от исходного сигнала флуоресценции. Измерения проводили в течение недели при комнатной температуре (24°C), все гели оставались прозрачными за время всего срока эксперимента, высыхания геля не наблюдалось. Общее время экспериментов составляло: для фрагментов ДНК длиной 27 нуклеотидов — 1 сутки, для красителя — 2 суток, для фрагментов длиной 103 н.п. — 3 суток. Также проводили специальное продолжительное (до 6 суток) исследование фрагментов длиной 27 нуклеотидов в плотных гелях (10%-й гель).



Образец геля в стеклянном капилляре, герметизированном с двух сторон полимерными крышками.

2. Результаты и обсуждение

2.1. Движение фронта красителя в гелях

Предварительные эксперименты позволили зарегистрировать различие диффузионного перемещения фронта красителя (черные чернила) в гелях с разной концентрацией акриламида [12]. По формуле Эйнштейна–Смолуховского можно косвенно оценить коэффициент диффузии D , зная время измерения (t) и диффузионное перемещение (δ) фронта красителя

$$\delta = \sqrt{2Dt}. \quad (1)$$

Таким образом, коэффициент диффузии красителя в 7%-м геле можно определить как $(1.9 \pm 0.1) \cdot 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$, а в 10%-м геле $(1.3 \pm 0.2) \cdot 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$. Полученные значения сопоставимы с экспериментальными оценками коэффициента диффузии чернил на водной основе ($0.96 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$) в гелях из соли кремниевой кислоты в работе [10]. Также эти значения хорошо согласуются с утверждением из [13], что при сильном набухании геля коэффициент диффузии гораздо выше обычных значений и близок к коэффициентам диффузии малых молекул и ионов в воде ($\sim 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$).

Так как зависимость перемещения фронта красителя от времени (t) можно представить в виде: $\delta \approx t^a$, то аппроксимация экспериментальных данных в двойных логарифмических координатах для используемых гелей позволила дать оценку параметра a : 1) 0.62 ± 0.03 при движении красителя вниз; 2) 0.49 ± 0.02 при движении вверх. При построении аппроксимаций коэффициент детерминации превышает 0.88. Число временных отсчетов составляло 6 (от 1.5 до 44 h), каждое насчитывает не

менее трех повторов. Так как диффузионному расстоянию (1) соответствует значение параметра $a = 1/2$, то можно сделать вывод, что экспериментальные данные подтверждают определяющий вклад диффузии. Направление перемещения фронта не оказывает на это существенного влияния.

2.2. Движение фронта меченых ампликонов в гелях

При оценке коэффициента диффузии ампликонов следует учитывать, что в настоящей работе исследуется перемещение достаточно коротких фрагментов ДНК (до 200 нуклеотидов). Их длина сопоставима с так называемой персистентной длиной ДНК (46–50 nm). В этом случае можно рассматривать фрагмент ДНК как негибкий прямолинейный стержень (диаметром $\sim 2 \text{ nm}$).

Для оценки коэффициента диффузии D в (1) можно использовать формулу Стокса–Эйнштейна в приближении сферической частицы:

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta r}, \quad (2)$$

где k_B — постоянная Больцмана, T — абсолютная температура, η — коэффициент динамической вязкости (для полиакриламидного геля $1.21 \cdot 10^{-3} \text{ Pa}\cdot\text{s}$), r — радиус частицы.

В качестве радиуса эквивалентной сферической частицы возьмем радиус инерции стержня $r = l/\sqrt{6}$, где l — длина стержня, пропорциональная количеству нуклеотидов N фрагмента ДНК (размер одного нуклеотида принимаем равным 0.34 nm). Для фрагмента ДНК длиной 103 пар нуклеотидов эквивалентный радиус r будет равен 14.3 nm, а для фрагментов длиной 27 нуклеотидов — 3.7 nm соответственно.

Если рассматривать конвективное движение (осаждение под действием силы тяжести) и сопоставлять его с диффузионным перемещением олигонуклеотидов, то сравнение их вклада определяется коэффициентом, имеющим смысл характеристического числа Пекле:

$$Pe = \frac{\pi d^3 L (\rho^* - \rho_0)}{6kT} g,$$

где d — эквивалентный диаметр инерции, рассчитанный на основе приближения прямолинейного стержня (для фрагмента 103 п.н. равен 28.5 nm), L — характерная длина, равная радиусу капилляра, ρ_0 — плотность среды (геля), принимаемая 1.2 g/cm^3 , ρ^* — плотность олигонуклеотида (за основу берется ДНК *E.coli*, $\rho^* = 1.69\text{--}1.73 \text{ g/cm}^3$), g примерно 9.8 m/s^2 .

Соответственно, число Пекле получается около 0.022, что позволяет пренебречь конвекцией и предполагать доминирование диффузионного перемещения олигонуклеотидов при перемещении фронта ампликонов в геле. Если при расчете числа Пекле в формулу (2) для коэффициента диффузии внесена не вполне корректная

Таблица 1. Экспериментально полученное перемещение фронта для ампликонов длиной 103 н.п. в гелях, изготовленных с разной концентрацией акриламида

Время, h	Перемещение границы фронта ампликонов, mm (коэффициент вариации, %)	
	7%-й гель ($n = 3$)	10%-й гель ($n = 3$)
20	1.33 ± 0.05 (4%)	0.78 ± 0.06 (8%)
38.5	—	1.24 ± 0.05 (4%)
45	1.9 ± 0.1 (6%)	1.4 ± 0.1 (8%)
68.5	2.5 ± 0.2 (7%)	1.7 ± 0.1 (6%)

и адекватная оценка эквивалентного диаметра инерции, истинное значение этого показателя может отличаться от расчетного в 2–3 раза. Однако это обстоятельство не повлияет на обоснованность гипотезы о доминировании диффузии над конвекцией.

Экспериментальные значения, полученные в гелях разной плотности, приведены в табл. 1. Для оценки величины коэффициента диффузии на основе значения диффузионного перемещения воспользуемся формулой (1). По оценке относительной погрешности косвенных измерений на основе погрешностей измерения расстояния (1 пиксель = $24 \mu\text{m}$) и времени (погрешность 1 h), относительная погрешность расчета коэффициента диффузии после 6 суток составила менее 1.7%. При этом рассчитанный параметр a степенной зависимости, соответствующий тангенсу угла наклона в двойных логарифмических координатах по трехкратным повторам всех измерений для 7%-го геля составляет 0.54 ± 0.03 с коэффициентом детерминации 0.977, что свидетельствует об очень высокой степени линейности. Для более плотного 10%-го геля параметр a составляет 0.52 ± 0.05 с коэффициентом детерминации 0.869. Таким образом, можно сделать вывод, что полученные данные соответствуют гипотезе о диффузионном перемещении по закону квадратного корня.

По оценкам расчетных значений коэффициент диффузии для фрагментов длиной 103 п.н. в 7%-м геле, составляет $(1.2 \pm 0.1) \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ ($n = 12$), а в 10%-м геле определяется как $(0.5 \pm 0.1) \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ ($n = 15$).

В качестве альтернативной оценки воспользуемся подходом определения коэффициента диффузии по скорости движения границы постоянной концентрации авторов работы [14]. При этом ограничение наложено на соотношение δ/L (где L — половина толщины образца), которое должно лежать в пределах от 0.4 до 0.9 [11]. Сравнение данных в двух точках, обе из которых удовлетворяют необходимым условиям, позволяют исключить данные о концентрации, тем самым для определения D решается уравнение

$$\ln(\cos(\pi(L - \delta_1)/2L)) - \ln(\cos(\pi(L - \delta_2)/2L)) = \pi^2 D(t_1 - t_2)/(4L^2). \quad (3)$$

В нашем случае ($L = 1.5 \text{ mm}$) для анализа подходят измерения, произведенные в более плотном 10%-м геле по истечении двух суток, т.е. 0.78, 1.24 и 1.40 mm, что соответствует 0.5, 0.8 и 0.9 от половины толщины образца. Последнее измерение незначительно выходит за верхнюю рекомендованную границу, поэтому можно допустить наличие незначительной погрешности расчета.

Оценка по данной формуле для двух отрезков от начальной точки (0.78 mm) соответствует $(0.35 \pm 0.05) \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$, что сопоставимо с предыдущими оценками другим методом $(0.5 \pm 0.1) \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$.

Согласно третьему способу оценки диффузии в приближении сферической частицы, расчетный коэффициент диффузии для этой модели соответствует $1.25 \cdot 10^{-11}$ и $1.17 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$. На основе предыдущих близких оценок можно, используя формулу Стокса–Эйнштейна, оценить радиус инерции ампликона и проанализировать применимость модели эквивалентной сферы применительно к нуклеотиду порядка 100 оснований в 10%-м геле. Так как динамическая вязкость среды соответствует $1.3 \cdot 10^{-3} \text{ Pa}\cdot\text{s}$, полученная оценка эквивалентного диаметра инерции оказывается больше полной длины олигонуклеотида и составляет порядка 100 nm, т.е. примерно 3–4 кратное расхождение оценок. Таким образом, модель эквивалентной сферы для такого фрагмента ДНК может применяться только для очень приближенных оценочных расчетов.

Экспериментальная оценка влияния концентрации акриламида на диффузию ампликонов в геле показывает, что при увеличении акриламида с 7 до 10% оценочные значения диффузии (по степенной зависимости) меняются в 2.3 раза. В работе [2], где сравнивали размер молекулярных колоний (полоний) в гелях разной плотности, для 6%-го и 10%-го гелей указано соотношение радиусов молекулярных колоний применительно к ампликонам длиной 120 п.н. Используя интерполяцию и полученную расчетную оценку для 7%-й концентрации акриламида, соотношение радиусов колоний (диффузионных расстояний) определяется как примерно 1.65. Следовательно, коэффициенты диффузии должны соотноситься как 2.7:1, что близко к нашей экспериментальной оценке (2.3:1).

2.3. Движение фронта меченых олигонуклеотидов в гелях

Экспериментальные значения для флуоресцентно меченых синтетических одноцепочечных фрагментов ДНК длиной 27 нуклеотидов, полученные в гелях разной плотности, представлены в табл. 2. Более короткому фрагменту соответствует диаметр инерции 10.2 nm, поэтому возможно использовать оценку коэффициента диффузии на основе диффузионного расстояния (1) и анализ применимости „сферического“ приближения (2). Оценка по альтернативному варианту (3) неприемлема, поскольку уже для второго временного отсчета (14 h)

Таблица 2. Перемещение границы фронта фрагментов ДНК длиной 27 нуклеотидов в гелях, изготовленных с разной концентрацией акриламида

Время, h	Перемещение границы фронта олигонуклеотидов, mm (коэффициент вариации, %)	
	7%-й гель ($n = 3$)	10%-й гель ($n = 2$)
2	0.74 ± 0.06 (9%)	—
14	2.6 ± 0.05 (2%)	1.8 ± 0.4 (24%)
18.5	2.9 ± 0.2 (6%)	2.0 ± 0.4 (19%)
24	3.4 ± 0.2 (5%)	2.3 ± 0.5 (24%)
37	—	2.8 ± 0.6 (22%)
46	—	2.8 ± 0.6 (23%)
68.5	—	3.6 ± 0.5 (13%)
143	—	4.7 ± 0.4 (9%)

требование, накладываемое на отношение δ/L , не выполнено (превышена верхняя граница).

Для 7%-го геля построенная по всем 12 экспериментальным точкам в двойных логарифмических координатах ($\ln(\delta); \ln(t)$) оценка тангенса угла наклона прямой дает результат 0.63 ± 0.02 (коэффициент детерминации 0.986). Эта оценка близка к теоретическому значению 0.5. При этом измерения, соответствующие моменту времени 2 h, при преобразовании координат по концепции Хьюбера могут рассматриваться, как точки риска, измерения в которых могут изменять оценки параметров линейного тренда. Правда, в отличие от точек разбалансировки, нет категорической рекомендации об их исключении. Параметр Хьюбера h_j в этих точках равен 0.319. По статусу точек риска это значение должно лежать в пределах от 0.2 до 0.5 [15]. Безопасными, т.е. рекомендованными для построения аппроксимирующих зависимостей, являются точки с параметрами, меньшими 0.2.

Величины h_j определяются на основе точек измерений выражением (4), а именно логарифмом времен измерения x_j :

$$h_j = \frac{S_2 - 2S_1x_j + S_0x_j^2}{S_0S_2 - S_1^2}, \quad (4)$$

где

$$S_k = \sum_{i=1}^n (x_i)^k, \quad k = 0, 1, 2.$$

Исключив измерение в этих точках, можно построить другую линейную аппроксимацию. Для нее оценка параметра положения дает результат 0.43 ± 0.06 (коэффициент детерминации также достаточно высок, а именно 0.876).

При оценке коэффициента диффузии через диффузионное расстояние для 2 h минимальное значение составляет $3.40 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$, при этом для всех остальных измерений усредненная оценка величины коэффициента диффузии через диффузионное расстояние δ дает

величину $(6.56 \pm 0.55) \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$. Однако в первом случае не исключено влияние погрешности определения начального момента отсчета времени диффузии при слишком короткой продолжительности наблюдения фронта, а во втором — влияние краевых эффектов.

В более плотных 10%-ных гелях для временных отсчетов 14, 24 и 41.5 h оценка δ составила 1.78, 2.26 и 2.82 mm соответственно. Последняя оценка — усреднение по отсчетам 37 и 46 h. Линеаризация зависимости $\delta(t)$ в двойных логарифмических координатах дает тангенс угла наклона прямой (показатель степени степенной зависимости) немного меньший 0.5, а именно 0.42 ± 0.02 . Полученная зависимость обладает высокой достоверностью, так как коэффициент детерминации превышает 0.994.

Суммарная оценка по всем измеренным значениям соответствует $(2.8 \pm 0.9) \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ ($n = 14$). Если расчет коэффициента диффузии проводится только по первой точке, для которой краевые эффекты с большой вероятностью отсутствуют, то оцененное по диффузионному расстоянию значение составляет $3.35 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$. Соответствующий диаметр инерции равен 9.7 nm, что весьма близко к сферическому приближению Стокса–Эйнштейна. Однако на больших временах происходит определенное „торможение“ фронта. Расчет коэффициента диффузии на больших временах по большим значениям δ демонстрирует уменьшение оценочного значения коэффициента диффузии до значения $(2.5–2.6) \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ при временах 46 и 68.5 h.

В естественных координатах (δ, t) зависимость аппроксимируется двумя линейными участками с точкой „склейки“ (перегиб зависимости) $t = 36 \text{ h}$ при δ около 2.8 mm. Это может свидетельствовать о том, что при большой длительности эксперимента характер зависимости $\delta(t)$ меняется и на результат исследования влияет дополнительный процесс, возможно связанный с уменьшением концентрации меченых фрагментов в приграничной зоне.

При увеличении концентрации акриламида с 7 до 10% оценочные значения коэффициента диффузии олигонуклеотидов (по степенной зависимости) изменяются в те же 2.3 раза, что и для ампликонов ДНК (см. выше).

Заключение

В работе проведено исследование влияния концентрации акриламида на диффузию ампликонов (фрагментов ДНК, получаемых в результате анализа) в геле. Для оценки коэффициентов диффузии рассматривались следующие методы расчета: 1) по степенной зависимости на основе формулы Эйнштейна–Смолуховского (при этом полученные данные проверяли на соответствие гипотезе о диффузионном перемещении по закону квадратного корня); 2) по скорости движения границы постоянной концентрации [14], если выполнялись необходимые условия ($0.4 \leq \delta/L \leq 0.9$); 3) в приближении

сферической частицы по формуле Стокса–Эйнштейна (с оценкой эквивалентного диаметра инерции). Значения коэффициента диффузии, полученные по первому и второму методу (для ампликонов в более плотном 10%-м геле) сопоставимы. Вторым методом можно рекомендовать для исследования плотных гелей, в которых регистрируются небольшие диффузионные перемещения. Модель эквивалентной сферы можно использовать для оценки коэффициента диффузии коротких фрагментов ДНК длиной 27 нуклеотидов, однако наблюдается сильное расхождение оценок для ампликонов длиной 103 пары нуклеотидов в 10%-м геле. Поэтому третий метод можно применять только для очень приближенных оценочных расчетов.

Экспериментальная оценка по степенной зависимости показывает, что при увеличении концентрации акриламида с 7 до 10% оценочные значения диффузии меняются в 2.3 раза как для ампликонов длиной 103 пары нуклеотидов, так и для фрагментов ДНК длиной 27 нуклеотидов. Это также хорошо соотносится с данными, рассчитанными по размерам колоний, сформированных ампликонами схожей длины [2].

Предложенный относительно простой способ оценки коэффициента диффузии можно использовать для прогнозирования результатов ожидаемых изменений размеров колоний при управлении свойствами геля (за счет увеличения концентрации акриламида). Это позволит разрабатывать топологию реакционных камер микрофлюидного чипа (а значит и геометрические размеры геля) в зависимости от поставленной задачи: миниатюризация размеров реакционных камер, увеличение динамического диапазона метода, оптимизация размеров получаемых колоний и др.

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Список литературы

- [1] А.Б. Четверин, Е.В. Четверина. Мол. биол., **36** (2), 320 (2002). [A.B. Chetverin, H.V. Chetverina. J. Mol. Biol., **36**, 244 (2002). DOI: 10.1023/A:1015378108109]
- [2] R.D. Mitra, G.M. Church. Nucleic Acids Res., **27** (24), e34 (1999). DOI: 10.1093/nar/27.24.e34
- [3] N. Baran, S. Goldin, I. Maidanik, D. Lindell. Nat. Microbiol., **3** (1), 62 (2018). DOI: 10.1038/s41564-017-0045-y
- [4] N.A. Sawaya, N. Baran, S. Mahank, A. Varsani, D. Lindell, M. Breitbart. Environ. Microbiol., **23** (11), 6622 (2021). DOI: 10.1111/1462-2920.15805
- [5] Л.А. Остерман. *Методы исследования белков и нуклеиновых кислот: Электрофорез и ультрацентрифугирование* (Наука, М., 1981)
- [6] Д.П. Храпцов, О.А. Сулягина, Б.Г. Покусаев, А.В. Вязьмин, Д.А. Некрасов. Теорет. основы хим. технол., **57** (1), 71 (2023). DOI: 10.31857/S0040357123010074
- [7] W. Jiang, M. Li, Z. Chen, K.W. Leong. Lab. Chip., **16** (23), 4482 (2016). DOI: 10.1039/c6lc01193d
- [8] B.G. Pokusaev, A.V. Vyazmin, N. Zakharov, S.S. Karlov, D.A. Nekrasov, V. Reznik, D. Khramtsov. Thermal Sci., **24** (1), 347 (2020). DOI: 10.2298/TSCI191101453P
- [9] Д.П. Храпцов, О.А. Сулягина, А.А. Мошин. Математические методы в технологиях и технике, **9**, 65 (2022). [D.P. Khramtsov, O.A. Sulyagina, A.A. Moshin. Mathem. Methods Technol. Tech., **9**, 65 (2022). DOI: 10.52348/2712-8873_MMTT_2022_9_65]
- [10] Б.Г. Покусаев, С.П. Карлов, А.В. Вязьмин, Д.А. Некрасов. Теплофизика и аэромеханика, **20** (6), 769 (2013). [B.G. Pokusaev, S.P. Karlov, A.V. Vyazmin, D.A. Nekrasov. Thermophys. Aeromechanics, **20** (6), 749 (2013). DOI: 10.1134/S0869864313060127]
- [11] А.Я. Малкин, А.Е. Чалых. *Диффузия и вязкость полимеров. Методы измерения* (Химия, М., 1979)
- [12] А.Н. Зубик, А.Л. Буляница, Г.Е. Рудницкая, А.А. Евстратов. *Тез. докл. 5-й междунар. конф. ФНЖ* (СПб, Россия, 2023), с. 133.
- [13] С.А. Дубровский. *Автореф. докт. дисс.* (ИХФ им. Н.Н. Семенова РАН, М., 2008)
- [14] S. Okuda, T. Iguchi, S. Nishina. Chem. Eng. J., **3** (1), 127 (1970).
- [15] П.Дж. Хьюбер. *Робастность в статистике* (Мир, М., 1984) [Пер. с англ.: P.J. Huber. *Robust Statistics* (NY. etc., 1981)]