Влияние напряжения и температуры на эффективность разделения одноцепочечных фрагментов ДНК при гель-электрофорезе в капиллярах длиной 25 cm

© *А.А. Федоров*[1], *Ю.А. Титов*[1], *К.Д. Ващенко*[1,2]

[1] Институт аналитического приборостроения РАН, Санкт-Петербург, Россия
[2] Научно-производственная фирма „Синтол“, Москва, Россия
E-mail: f_aa@mail.ru

Поступило в Редакцию 5 мая 2026 г.
В окончательной редакции 21 августа 2026 г.
Принято к публикации 23 октября 2026 г.

Исследуется влияние температуры и напряжения на продолжительность и разрешающую способность капиллярного гель-электрофореза одноцепочечных фрагментов ДНК длиной до 520 нуклеотидов. Определены оптимальные значения напряжения и температуры для минимизации времени анализа при сохранении разрешающей способности электрофореза в один нуклеотид в капиллярах длиной 25 cm до окна детекции. При проведении фрагментного анализа ДНК в 96-луночном планшете в предложенном режиме и использовании восьмикапиллярной линейки общее время анализа может быть сокращено почти на 3 h.

Ключевые слова: секвенирование ДНК, генетический анализатор, капиллярный гель-электрофорез, НАНОФОР 05.

DOI: 10.61011/PJTF.2026.23.64016.9752k

Капиллярный гель-электрофорез является ключевым методом высокоточного анализа нуклеиновых кислот, находящим широкое применение в секвенировании по Сенгеру и фрагментном анализе ДНК. В основе метода лежит разделение фрагментов нуклеиновых кислот по молекулярной массе, основанное на их миграции под действием силы электрического поля, через просеивающий полимер [1–3].

Сфера применения генетического анализа методом капиллярного электрофореза непрерывно расширяется. Интенсификация потока исследований стимулирует поиск путей минимизации временны́х затрат на проведение анализов. Поскольку фрагментный анализ (за исключением приложений, требующих разрешения в один нуклеотид, таких как микросателлитный анализ или детекция однонуклеотидных полиморфизмов) предъявляет менее жесткие требования к разрешающей способности, чем секвенирование, он предоставляет больше возможностей для оптимизации.

Разрешающая способность электрофореза (способность разделять близкие по размеру и заряду молекулы биополимеров) определяется комплексом физико-химических факторов: характеристики разделительной среды, состав буфера, а также наличие денатурирующих добавок. Разделительные среды для капиллярного электрофореза ДНК могут быть представлены как жесткими поперечно сшитыми, так и текучими линейными гелями на основе акриламида, а также матрицами из полисахаридов (агарозы, производных целлюлозы, декстранов) и других водорастворимых полимеров, таких как полиэтиленоксид и поливинилпирролидон [4]. Среди основных физических факторов можно выделить напряженность электрического поля, длину капилляра и температуру. Увеличение напряженности электрического поля ускоряет анализ, но может привести к снижению разрешения разделяемых фрагментов ДНК из-за усиления джоулева нагрева и эффектов ориентации молекул [5,6]. Температура оказывает влияние как на скорость, так и на эффективность процесса разделения. Увеличение эффективной длины капилляра способствует повышению разрешения и длины прочтения, но пропорционально увеличивает время анализа. В настоящее время в рутинных исследованиях для фрагментного генетического анализа установлен стандарт длины капилляров 36 cm до окна детекции.

В Институте аналитического приборостроения РАН, разработавшем совместно с ООО „НПФ СИНТОЛ“ отечественный капиллярный секвенатор НАНОФОР 05, был введен новый, самый компактный формат капилляров (длиной 25 cm до окна детекции), предназначенных для оценки качества подготовленных геномных библиотек для полногеномного секвенирования посредством проведения неденатурирующего электрофореза.

Целью настоящей работы является исследование разрешающей способности линеек длиной 25 cm до окна детекции для стандартного денатурирующего электрофореза одноцепочечных фрагментов ДНК в зависимости от температуры и напряжения на капилляре.

Капиллярный гель-электрофорез с детектированием лазер-индуцируемой флуоресценции проводили на генетическом анализаторе НАНОФОР 05 [7]. Для исследования использовали капилляры с внутренним диаметром 50 μm, которые были собраны в линейки из восьми

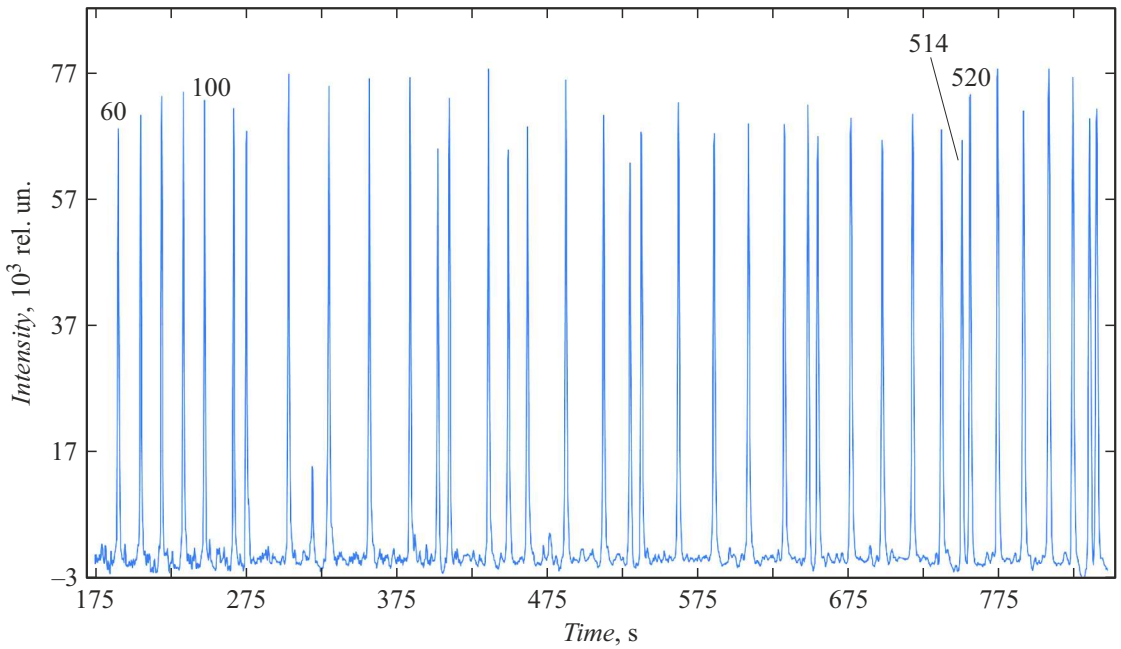


Рис. 1. Электрофореграмма фрагмента калибратора СД-1200 при 50 °C и 12 kV. Числа — длина соответствующего одноцепочечного фрагмента ДНК в нуклеотидах.

капилляров каждая (Институт аналитического приборостроения РАН, Россия).

Для исследований был выбран гель ПДМА-6 (ООО „НПФ СИНТОЛ“, Россия) на основе линейного поли-N,N-диметилакриламида (ПДМА), который находит широкое применение благодаря максимальному снижению электроосмотического потока, низкой вязкости и высокой разрешающей способности.

Анализ эффективности деления проводили с помощью стандарта длин фрагментов ДНК СД-1200 (ООО „НПФ СИНТОЛ“, Россия), представляющего собой набор одноцепочечных фрагментов ДНК длиной от 60 до 1200 нуклеотидов. Каждый фрагмент содержит на 5′-конце флуоресцентный краситель Sy-660 ($\lambda_{\max}$ эмиссии равна 660 nm), позволяющий детектировать проходящие через окно детектора разделенные фрагменты ДНК в виде пиков на соответствующем данному красителю спектральном канале генетического анализатора НАНОФОР 05.

Подготовка проб и анализ данных проводились следующим образом: 2 μl раствора стандарта длин ДНК СД-1200 смешивали с 78 μl деионизованного формамида (ООО „НПФ СИНТОЛ“, Россия) и раскапывали по 10 μl в стрип на восемь пробирок емкостью 0.2 ml. Электрофорез проводили с тройным повтором по стандартному протоколу (время префореза 3 min, напряжение ввода пробы 1.8 kV, время ввода пробы 5 s), варьируя температуру в диапазоне 50–65 °C и напряжение электрофореза от 9 до 13 kV.

Пример электрофореграммы разделения стандарта длин фрагментов ДНК СД-1200 приведен на рис. 1.

Значения времен выхода и ширин пиков на полувысоте использовали для расчета разрешающей способности системы при заданных значениях напряженности электрического поля и температуры. При фрагментном анализе ДНК в зависимости от задачи исследования диапазон разделяемых фрагментов может изменяться в пределах от 20–25 до 450–500 нуклеотидов (идентификация личности и популяционные исследования, идентификация сортов и гибридов растений). В связи с этим при оценке разрешающей способности использовались параметры пиков, соответствующих одноцепочечным фрагментам ДНК длиной 514 и 520 нуклеотидов.

Разрешающую способность, как и в работе [2], оценивали по формуле

$$R = \frac{2\Delta T}{(W_1 + W_2)\Delta M},$$

где ΔT — расстояние между максимумами двух пиков; W_1 и W_2 — ширины соседних пиков на полувысоте; ΔM — разница в количестве нуклеотидов между фрагментами ДНК, соответствующими данным пикам (шесть нуклеотидов).

Найденные значения R в каждом капилляре использовали для нахождения среднего значения разрешающей способности R_{av} по всем восьми капиллярам линейки.

Экспериментально установлено, что для разных полимеров и разных условий электрофореза значение R_{av}, соответствующее разрешению в один нуклеотид, составляет $R_{av} = 0.5$ [2].

В табл. 1 и на рис. 2 приведены результаты исследования влияния напряжения и температуры на R_{av}. В табл. 2 и на рис. 3 приведены значения времен выхода пиков фрагментов ДНК длиной 520 нуклеотидов, определяющие продолжительность анализа.

Таблица 1. Влияние температуры и напряжения на значения разрешающей способности R_{av} (жирным шрифтом выделены режимы, обеспечивающие разделение в один нуклеотид)

T, °C	U, kV				
	9	10	11	12	13
50	**0.64 ± 0.03**	**0.59 ± 0.02**	**0.54 ± 0.04**	0.48 ± 0.02	0.39 ± 0.03
55	**0.69 ± 0.03**	**0.65 ± 0.04**	**0.55 ± 0.03**	0.48 ± 0.03	0.43 ± 0.03
60	**0.68 ± 0.02**	**0.64 ± 0.03**	**0.57 ± 0.03**	**0.53 ± 0.03**	0.43 + 0.03
65	**0.69 ± 0.03**	**0.64 ± 0.03**	**0.60 ± 0.03**	**0.55 ± 0.02**	0.47 ± 0.02

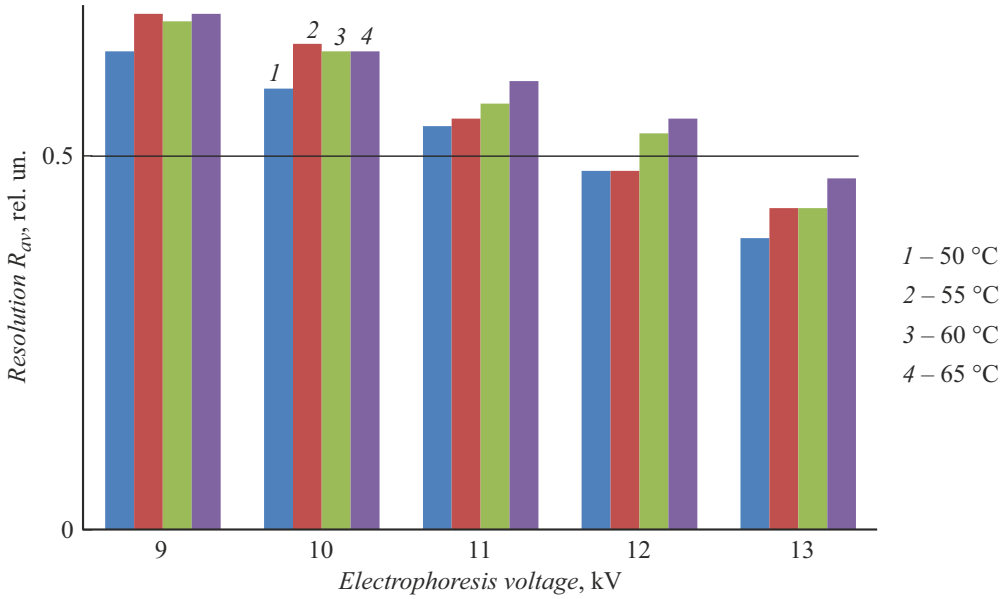


Рис. 2. Влияние температуры и напряжения на разрешающую способность анализа R_{av}. Горизонтальная линия показывает режимы, обеспечивающие разделение в один нуклеотид ($R_{av} \geqslant 0.5$).

Таблица 2. Время выхода (в s) фрагмента длиной 520 нуклеотидов (жирным шрифтом выделены режимы, обеспечивающие разделение в один нуклеотид)

T, °C	U, kV				
	9	10	11	12	13
50	**1484 ± 5**	**1315 ± 5**	**1188 ± 5**	1080 ± 5	999 ± 4
55	**1405 ± 6**	**1268 ± 5**	**1134 ± 6**	1035 ± 4	946 ± 4
60	**1343 ± 5**	**1208 ± 3**	**1086 ± 5**	**983 ± 4**	918 ± 5
65	**1291 ± 5**	**1148 ± 4**	**1056 ± 4**	**951 ± 5**	883 ± 5

Как видно из представленных данных, для линеек длиной 25 cm до окна детекции при условии сохранения разрешения в один нуклеотид минимальное время анализа достигается при 12 kV и 65 °C и составляет около 28 min (с учетом времени ввода пробы и префореза, занимающих $\sim$ 650 s). Для сравнения при стандартной длине капилляров в 36 cm до окна детекции и стандартном режиме анализа прибора НАНОФОР 05 (12.2 kV, 60 °C) время фрагментного анализа нуклеотидов длиной не более 520 составляет около 43 min.

Таким образом, исходя из представленных данных можно сделать вывод, что при проведении фрагментного анализа ДНК в стандартном формате 96-луночного планшета при использовании восьмикапиллярной линейки длиной 25 cm и режима 12.2 kV/65 °C общее время анализа может быть сокращено на 3 h. Представленные в табл. 1 и 2 данные показывают, что увеличение температуры даже на несколько градусов может приводить к заметному увеличению разрешающей способности и сокращению времени выхода фрагментов, что может рассматриваться как путь для дальнейших поисков по сокращению времени анализа. Так, из табл. 2 видно, что при увеличении напряжения до 13 kV, а температуры до 65 °C разрешающая способность приближается к

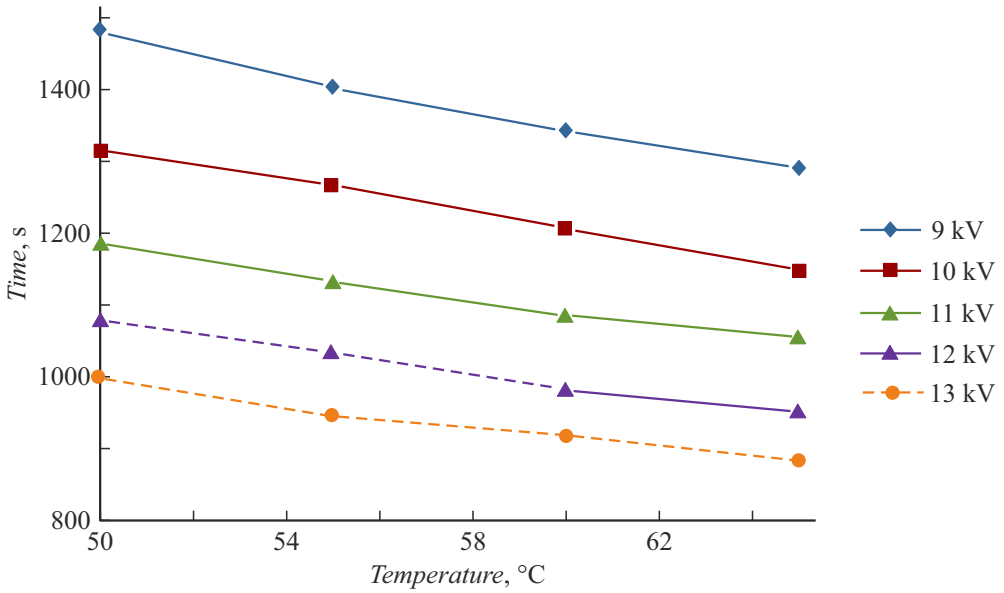


Рис. 3. Время выхода фрагмента длиной 520 нуклеотидов в зависимости от напряжения и температуры. Сплошные линии показывают режимы, позволяющие получить разделение в один нуклеотид ($R_{av} \geqslant 0.5$), штриховые — не позволяющие получить такое разделение ($R_{av} < 0.5$).

порогу разделения в один нуклеотид. Однако следует отметить, что с ростом температуры ухудшается и соотношение сигнал/шум, но численные измерения данного параметра в работе не проводились. В рамках последующих исследований планируется увеличить объем экспериментальной выборки для оценки воспроизводимости результатов, а также провести статистический анализ для оценки значимости различий между исследуемыми условиями.

Финансирование работы

Исследование выполнено за счет государственного задания Министерства науки и высшего образования РФ № 075-00440-26-00.

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

Список литературы

[1] Д.В. Бочарова, Я.И. Алексеев, А.А. Волков, Г.С. Лавров, А.Г. Плугов, И.А. Волков, А.А. Чемигов, Б.В. Бардин, В.Е. Курочкин, Журнал аналитической химии, **76** (12), 1100 (2021). DOI: 10.31857/S0044450221100042 [D.V. Bocharova, Ya.I. Alekseev, A.A. Volkov, G.S. Lavrov, A.G. Plugov, I.A. Volkov, A.A. Chemigov, B.V. Bardin, V.E. Kurochkin, J. Anal. Chem., **76** (12), 1408 (2021). DOI: 10.1134/S106193482110004X].

[2] Д.В. Бочарова, Я.И. Алексеев, В.Е. Курочкин, Журнал аналитической химии, **75** (12), 1148 (2020). DOI: 10.31857/S0044450220100035 [D.V. Bocharova, Ya.I. Alekseev, V.E. Kurochkin, J. Anal. Chem., **75** (12), 1633 (2020). DOI: 10.1134/S1061934820100032].

[3] Y. Xu, X. Chen, S. Fan, T. Zhang, B. Yang, Z. Li, S. Yamaguchi, D. Zhang, J. Fluoresc., **35**, 9317 (2025). DOI: 10.1007/s10895-025-04239-55

[4] Z. Wang, P. Wang, C. Tao, D. Zhang, Z. Li, Y. Yamaguchi, Anal. Chim. Acta, **1178**, 338811 (2021). DOI: 10.1016/j.aca.2021.338811

[5] L.A. Holland, L.D. Casto-Boggess, Annu. Rev. Anal. Chem., **16**, 161 (2023). DOI: 10.1146/annurev-anchem-091522-0802076

[6] A. Guttman, F. Auer, Gels, **12**, 29 (2026). DOI: 10.3390/gels12010029

[7] А.А. Волков, И.А. Волков, А.Г. Плугов, Е.В. Кулябина, О.Н. Мелкова, Г.С. Лавров, Д.В. Бочарова, Я.И. Алексеев, Измерительная техника, № 1, 60 (2021). DOI: 10.32446/0368-1025it.2021-1-60-65 [A.A. Volkov, I.A. Volkov, A.G. Plugov, E.V. Kulyabina, O.N. Melkova, G.S. Lavrov, D.V. Bocharova, Ya.I. Alekseev, Meas. Tech., **64** (1), 64 (2021). DOI: 10.1007/s11018-021-01897-2].