

ТЕПЛОВЫЕ ПРОЦЕССЫ ПРИ ЭЛЕКТРОФОРЕЗЕ В УСЛОВИЯХ ВЫСОКОЙ ИОННОЙ СИЛЫ

© 2025 г. Н.П. Сирота*, #, Е.П. Хижняк*, Л.Н. Хижняк*, Т.В. Сирота*, Е.А. Кузнецова*

*Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН,
Институтская ул., 3, Пущино Московской области, 142290, Россия

#E-mail: sirota@iteb.ru

Поступила в редакцию 30.11.2024 г.

После доработки 16.12.2024 г.

Принята к публикации 18.12.2024 г.

Ранее нами была показана температурная неоднородность электрофоретического раствора, динамически изменяющаяся в процессе электрофореза в области платформы для гелей. Чтобы понять причины этого эффекта мы применили П-образные вставки в колодцы электрофоретической камеры, выступающие над поверхностью электрофоретического раствора, но не влияющие на протекающие токи. Проведенное исследование показало, что миграция нагретых масс раствора обусловлена разной скоростью продукции водорода и кислорода на платиновых электродах. Используя технику теплового мониторинга в реальном времени, мы показали, что в случае использования П-образных вставок нагрев имеет однородный характер вплоть до 7°C по всему объему раствора, находящемуся над платформой для гелей. В области колодцев нагрев жидкости происходил с меньшей динамикой и не идентично. В колодце катода нагрев жидкости происходит незначительно (всего 1.5°C), а у анода прирост составляет 2.5°C. Мы полагаем, что температурная однородность будет иметь существенное значение для снижения вариабельности результатов, получаемых методом Comet assay (ДНК-комет) на препаратах, подвергающихся щелочному электрофорезу.

Ключевые слова: нуклеотиды, ДНК-кометы, щелочной электрофорез, ИК-термограммы.

DOI: 10.31857/S0006302925010162, EDN: LUMFXB

Нами впервые была показана температурная неоднородность электрофоретического раствора, динамически изменяющаяся в процессе электрофореза в области платформы для гелей [1]. В основе метода ДНК-комет (Comet assay, комета-тест) лежит гель-электрофорез ДНК индивидуальных нуклеотидов. Метод широко используется исследователями для выявления одиночных разрывов во внутриклеточной ДНК. Он чувствителен, универсален и использовался более чем в нескольких тысячах исследований [2–6].

Несмотря на столь широкое применение и 40-летнюю историю существования метода ДНК-комет, вариабельность в результатах межлабораторных исследований, выполняемых по согласованным протоколам, вызывает обеспокоенность исследователей. Поиск причин, вызывающих вариабельность в результатах, остается актуальным [7]. Исследователи моделируют и сравнивают

различные источники изменчивости в результатах анализа [8].

Оценка генотоксичности на уровне индивидуальных клеток производится по миграции ДНК из нуклеотидов в агарозном геле. Для повышения чувствительности метода было предложено проводить электрофорез в щелочных условиях [9].

Использование щелочного раствора высокой ионной силы сопровождается повышенной генерацией тепла в процессе электрофореза. Превращение щелоче-лабильных сайтов в одиночные разрывы в цепях ДНК — это температурно-зависимый процесс, особенно в щелочных условиях при высоких pH [10, 11]. Ранее нами было показано динамическое изменение температуры электрофоретического раствора в процессе электрофореза [1].

Целью данной работы было изучение процесса тепловыделения при щелочном электрофорезе и оценка пространственного распределения нагрева в условиях минимизации конвекции, а также выяснение условий, при которых бы происходил однородный нагрев раствора в области размещения препаратов с нуклеотидами в течение всей

Сокращения: LMA — агароза с низкой температурой плавления, ИК — инфракрасная, TL — длина «хвоста» ДНК-кометы в пикселях, %TDNA — доля ДНК в «хвосте» ДНК-кометы в процентах.

процедуры щелочного электрофореза без использования специального оборудования для термостатирования электрофоретического раствора.

Проведенное исследование показало, что миграция тепловых масс обусловлена разной скоростью газообразования на платиновых электродах. Мы применили П-образные вставки в колодцы электрофоретической камеры, выступающие над поверхностью электрофоретического раствора и тем самым препятствующие миграции тепловых масс, но не влияющие на протекание тока. Используя технику теплового мониторинга в реальном времени, мы показали, что в результате нагрев имеет однородный характер по всему объему раствора, находящемуся над платформой для гелей. В области колодцев нагрев жидкости происходит с меньшей динамикой и не идентично. В колодце для катода нагрев жидкости происходит незначительно (всего 1.5°C), а у анода прирост составляет 2.5°C .

Таким образом, нами показано, что присутствие П-образных вставок, отражающих первичные конвективные потоки, возникающие в области электродов, существенно снижает неравномерность пространственного распределения нагрева в электрофоретическом растворе. Первичные конвекционные потоки жидкости, формируемые в результате газообразования на электродах, достаточно эффективно экранируются П-образными вставками и практически не распространяются в область расположения слайдов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы. Агароза с низкой температурой плавления (LMA) была производства компании Sigma-Aldrich (США). Агароза с нормальной температурой плавления и прочие химикаты были приобретены у компании «Хеликон» (Россия).

Электрофорез проводили при комнатной температуре или в бытовом холодильнике, используя электрофоретическую камеру SE-1/S-1N (ООО «НПФ Хеликон», Россия) с внутренним размером 22.0×7.5 см. Камера содержала 250 мл щелочного раствора А (0.3 моль/л NaOH, 0.001 моль/л ЭДТА, $\text{pH} > 13$). Продолжительность электрофореза составляла 15 мин. Приложенное напряжение — 27 вольт, а ток — 350–400 мА. Был использован источник питания со стабилизацией по напряжению «Эльф-4» (ООО «ДНК-технология», Россия).

Препараты (слайды). Препараты, содержащие клетки в легкоплавкой агарозе, готовили с использованием специального набора приспособлений [12]. Клетки асцитной карциномы Эрлиха в физиологическом растворе, забуференном фосфатом и содержащим 0.001 моль/л ЭДТА (PBS-

EDTA-буфер), $\text{pH} 7.2$, смешивали с равным объемом 1% LMA, расплавленной при 70°C в PBS-EDTA-буфере, и инкубировали при 37°C . Смесь (5 мкл) наносили на поверхность агарозы с нормальной температурой плавления. После охлаждения и затвердевания смеси на ее поверхность наносили новый слой 0.5% LMA.

После процедуры лизиса клеток, препараты консервировались и хранились в морозильной камере бытового холодильника [13]. Перед процедурой электрофореза препараты извлекались из морозильника и обрабатывались согласно ранее опубликованному протоколу [13].

Предметные стекла после перемещения в щелочной раствор А инкубировали в течение 20 мин при 4°C . Затем их переносили в электрофоретическую камеру, заполненную раствором А, и подвергали электрофорезу.

Инфракрасная термография. Изменение распределения температуры на поверхности щелочного раствора наблюдали с помощью неохлаждаемой инфракрасной камеры на спектральный диапазон чувствительности 8–12 мкм типа JADE UC (CEDIP, Франция), оснащенной матрицей фотоприемников с пространственным разрешением 384×288 , обеспечивающей точность измерения температуры 0.15°C при скорости записи 50 кадров в секунду. Инфракрасная (ИК) камера была откалибрована для температурного диапазона от 5 до 50°C . 14-битная оцифровка ИК-данных позволила записывать ИК-изображения во всем заданном температурном диапазоне.

Захват и обработку ИК-изображений осуществляли с использованием программного обеспечения типа ALTAIR. Последовательность инфракрасных изображений первоначально была записана со скоростью 50 кадров в секунду. Затем каждые 50 кадров усредняли (что позволило снизить температурный шум камеры до 0.02°C), усредненные ИК-изображения записывали в память компьютера с интервалом в 1 с для дальнейшей обработки.

Перед началом измерений электрофоретическую камеру, заполненную раствором А, выдерживали в течение 20–30 мин, чтобы стабилизировать ее до комнатной температуры. За процессом стабилизации температуры раствора А следили с помощью ИК-камеры, расположенной на расстоянии 50 см над поверхностью раствора.

Для устранения погрешностей в измерениях температуры, связанных с исходной неравномерностью температуры на поверхности раствора и влиянием условий окружающей среды, был использован метод дифференциальных ИК-термограмм. Для этого за 1 мин до начала электрофореза записывали последовательность из 60 усредненных ИК-изображений, а затем вычисляли среднее ИК-изображение и вычитали его из всех

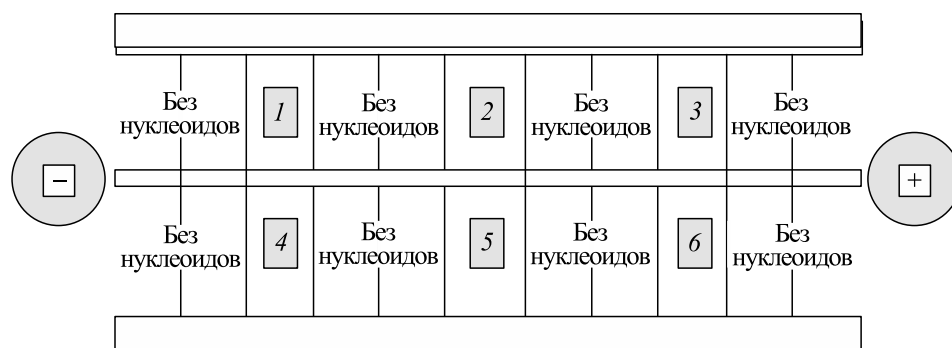


Рис. 1. Схема расположения препаратов на подложке для перемещения из лизирующего, щелочного раствора и на платформу для гелей используемого танка: 1–6 — препараты с нуклеоидами в агарозном геле, без нуклеоидов — только гель на поверхности мини-стекол.

ИК-изображений, записанных во время электрофореза.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для оценки влияния температурной неравномерности на измеряемые параметры комета-теста мы первоначально провели эксперимент с идентичными препаратами, расположенными в разных местах на платформе электрофоретической камеры (рис. 1).

Эксперименты были выполнены без использования П-образных вставок при разных стартовых температурах электрофоретического раствора. Полученные результаты представлены в табл. 1. Из наших многолетних экспериментальных данных мы знаем, что зависимость между длиной «хвоста» ДНК-кометы и долей ДНК, обнаруживаемой в «хвосте», носит линейный характер. Удивительно, но ранжирование слайдов в зависимости от длины «хвоста» кометы не совпадает с ранжированием по доле ДНК в «хвосте» кометы.

Из данных, представленных в табл. 1, четко видно влияние стартовой температуры электрофоретического раствора на результаты измерений. Проведение электрофореза при более высокой стартовой температуре (20–22°C) увеличивает длину «хвоста» ДНК-кометы в 1.3 раза, а долю ДНК в «хвосте» в 1.2 раза. Различия между результатами электрофореза (4°C и 20°C) статистически достоверны по обоим регистрируемым параметрам — TL(pix) и %TDNA — по 6 слайдам, $P < 0.001$.

Полученные результаты послужили основанием для более внимательного изучения теплообразования при электрофорезе в условиях высокой ионной силы.

Внимательное изучение видеоматериалов, опубликованных нами ранее в виде видеофайла [1], навело нас на мысль посмотреть, что будет происходить с тепловыми процессами, если сделать механическую преграду для первичных конвекций, не влияющую на прохождение тока через

Таблица 1. Влияние стартовой температуры на параметры комета-теста, определяемые на индивидуальных слайдах

4°C			20°C		
Слайд	TL(pix)	%TDNA	Слайд	TL(pix)	%TDNA
5	132.6	34.9	6	198.2	42.1
1	147.0	34.1	4	202.3	45.3
2	153.7	41.7	3	202.0	45.9
3	158.5	41.2	5	206.7	46.0
4	166.2	39.6	2	207.6	48.5
6	168.3	38.7	1	204.7	49.9
Mean + SD	154.4 + 13.3	38.4 + 3.2	Mean + SD	203.58 + 3.5	46.3 + 2.7

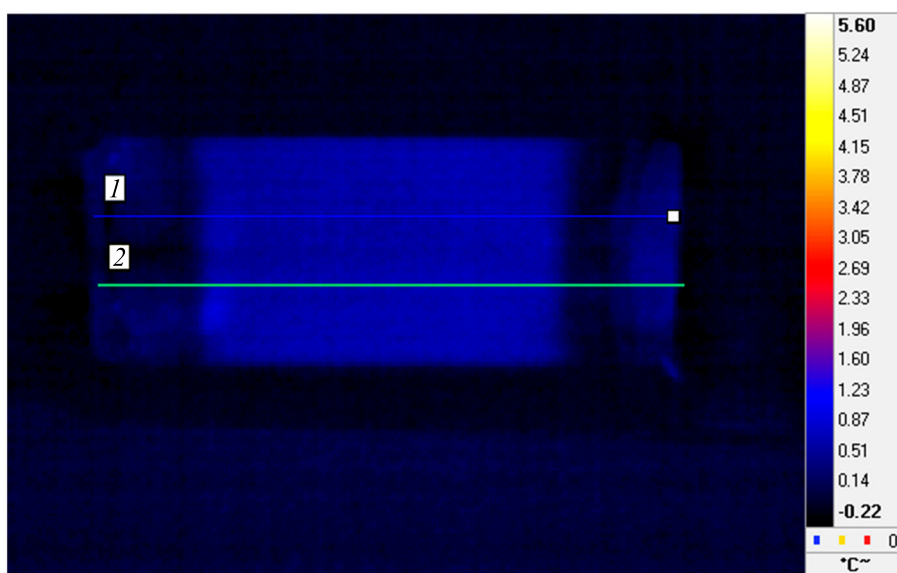


Рис. 2. Тепловой образ раствора в камере для электрофореза с П-образными вставками через 1 мин после подачи напряжения (в псевдоцветах); 1 и 2 — сечения для вычисления температурных профилей на ИК-термограммах.

электрофоретический раствор. Все результаты, представленные ниже, были получены с использованием П-образных мембран при электрофорезе.

Теплообразование при прохождении тока через жидкости зависит от скорости движения ионов в направлении электродов. На результат влияет температура окружающей среды и скорость теплообмена с ней. По этой причине мы первоначально провели модельные эксперименты с электрофоретической камерой, хранившейся при комнатной температуре, как и используемый электрофоретический раствор. Тем самым достигалась температурная идентичность камеры и раствора до подачи напряжения на электроды. После подачи напряжения проводили мониторинг выделения тепла по всей поверхности электрофоретического танка с использованием тепловизора.

На рис. 2 представлен тепловой образ (в псевдоцветах) электрофоретического танка через 1 мин после подачи напряжения.

ИК-термограммы, представленные на рис. 3, демонстрируют, что первичные конвекционные потоки, образующиеся в результате газообразования на электродах, практически не влияют на пространственное распределение нагрева в электрофоретическом растворе в области расположения слайдов. При этом электрофоретический раствор в области слайдов нагревается сильнее по сравнению с областью колодцев.

Визуальный анализ термограмм, представленных на рис. 3, позволяет сделать предположение о равномерном нагреве раствора по всей платфор-

ме для гелей в процессе электрофореза. Для более адекватной оценки мы сделали вычисление температуры на этих термограммах по сечениям 1 и 2 (внутренняя область электрофоретической камеры, заполненная жидкостью, рис. 2).

Температурные профили, представленные на рис. 4, вычислялись на интервале с 1 по 15 мин прохождения тока через раствор. Обращает на себя внимание, что к 15-й минуте распределение температуры приобретает форму колокола. Перепад температур между серединой платформы и ее краями составляет около 2°C (см. пунктирную линию на рис. 4). Из представленных графических данных можно сделать предположение: чтобы минимизировать краевые температурные эффекты, препараты с нуклеотидами необходимо располагать в центральной зоне (порядка $2/3$ длины платформы для гелей).

Рис. 4 демонстрирует, что относительные температурные флуктуации ограничиваются областью, обозначенной вертикальными прямоугольниками (расположение П-образных мембран в колодцах камеры). В области, расположенной между мембранами и платформой для гелей, следуют монотонные участки нагрева, где значения скорости нагрева имеют практически линейный характер.

В области слайдов, расположенной между сплошными вертикальными линиями, уже через 1 мин после подачи напряжения на электроды наблюдается практически равномерный нагрев электрофоретического раствора. С 5-й по 15-ю минуты после подачи напряжения на электроды формируется монотонная колоколообразная

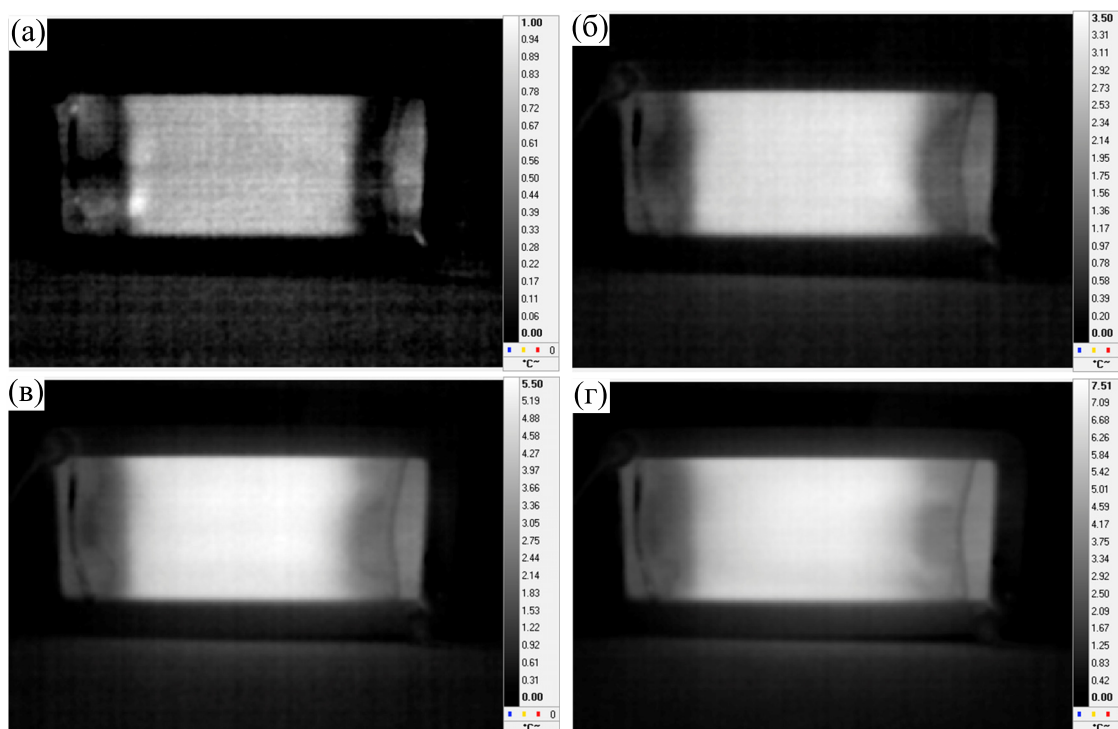


Рис. 3. ИК-термограммы, зарегистрированные через 1 (а), 5 (б), 10 (в) и 15 мин (г) после подачи напряжения на электроды.

неравномерность пространственного распределения нагрева в электрофоретическом растворе с дополнительным перегревом в правой области.

Колоколообразная форма кривых нагрева в области, расположенной между вертикальными

прямоугольниками, обусловлена условиями теплоотвода с поверхности раствора.

Необходимо отметить, что в отличие от случая присутствия конвекции, обусловленной выделением газовых пузырьков в области электродов, описанного в работе [1], в нашем случае пространственное распределение нагрева в электрофоретическом растворе имеет предсказуемый характер. Таким образом, первичные конвекционные потоки жидкости, формируемые в результате

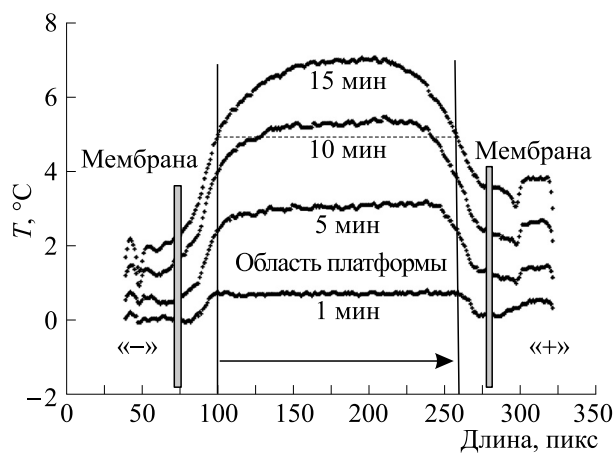


Рис. 4. Температурные профили, вычисленные на ИК-термограммах (см. рис. 3). Ось ординат — прирост температуры электрофоретического раствора. Ось абсцисс — длина внутренней части танка в пикселях. Стрелка — направление электрофореза. Вертикальные прямоугольники обозначают расположение П-образных вставок в колодцах камеры. Сплошные вертикальные линии — границы платформы для гелей.

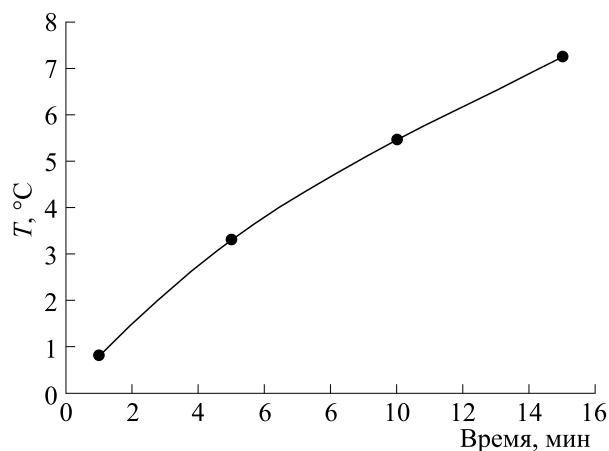


Рис. 5. Динамика прироста температуры в процессе электрофореза в области платформы для гелей. Ось ординат — прирост температуры электрофоретического раствора.

газообразования на электродах, достаточно эффективно экранируются П-образными вставками и практически не распространяются в область расположения экспериментальных образцов (слайдов).

Динамика прироста температуры в процессе электрофореза в области платформы для гелей показана на рис. 5. Из графика видно, что прирост носит линейный характер, достигая к 15 мин величины 7°C, что хорошо совпадает с нашими данными, ранее полученными при контроле температуры в центре камеры с помощью термистора Карманова. Важно отметить, что прирост носит не идентичный характер по всему объему раствора. Изменение температуры начинается практически сразу после подачи напряжения на электроды. Уже к концу первой минуты наблюдается равномерный нагрев всего объема раствора в области платформы для гелей (рис. 2). В литературе имеются данные, что градиент температуры в 1°C изменяет подвижность на 3%, влияя на воспроизводимость результатов.

ВЫВОДЫ

П-образные вставки в электрофоретических колодцах камеры предотвращают конвекцию тепловых потоков. Тем самым создаются условия равномерного нагрева раствора над всей поверхностью платформы для гелей в процессе электрофореза. Это, по-видимому, может уменьшать вариабельность в миграции ДНК из индивидуальных нуклеоидов, присутствующих на разных слайдах в электрофоретической камере. Нагрев раствора развивался на геометрической середине камеры (между электродами). Далее, помимо роста температуры, происходило смещение максимально регистрируемой температуры раствора в сторону анода.

БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаем благодарность Т.Н. Михайловской за помощь в регистрации микрофотографий с ДНК-кометами.

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Работа выполнена в рамках Государственного задания ИТЭБ РАН (№ 075-00224-24-00 и № 075-00224-24-01).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, связанных с изложенными в статье данными.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания собственных исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Khizhnyak E. P., Sirota N. P., Kuznetsova E. A., Khizhnyak L. N., and Sirota T. V. Heating and convection are associated with alkaline electrophoresis. *Electrophoresis*, **42** (9–10), 1153–1157 (2021). DOI: 10.1002/elps.202000337
2. Cordelli E., Bignami M., and Pacchierotti F. Comet assay: A versatile but complex tool in genotoxicity testing. *Toxicol. Res.*, **10** (1), 68–78 (2021). DOI: 10.1093/toxres/tfaa093
3. Bajpayee M., Kumar A., and Dhawan A. Chapter 1: The Comet Assay: A Versatile Tool for Assessing DNA Damage. In: *The comet assay in toxicology*, Ed. by D. Anderson and A. Dhawan, 2nd ed. (The Royal Society of Chemistry, Cambridge, UK, 2016), ch. 1, pp. 3–64. DOI: 10.1039/9781782622895-00001
4. Olive P. L. and Banáth J. P. The comet assay: A method to measure DNA damage in individual cells. *Nature Protocols*, **1** (1), 23–29 (2006). DOI: 10.1038/nprot.2006.5
5. Ostling O. and Johanson K. J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **123** (1), 291–298 (1984). DOI: 10.1016/0006-291x(84)90411-x
6. Kuznetsova E. A., Sirota N. P., Mitroshina I. Y., Pikalov V. A., Smirnova E. N., Rozanova O. M., Glukhov S. I., Sirota T. V., and Zaichkina S. I. DNA damage in blood leukocytes from mice irradiated with accelerated carbon ions with an energy of 450 MeV/nucleon. *Int. J. Radiat. Biol.*, **96**, 1245–1253 (2020).
7. Möller P., Azqueta A., Colliá M., Bakuradze T., Richling E., Bankoglu E. E., Stopper H., Bastos V. C., Langie S. A. S., Jensen A., Ristori S., Scavone F., Giovannelli L., Wojewódzka M., Kruszewski M., Valdiglesias V., Laffon B., Costa C., Costa S., Teixeira J. P., Marino M., Del Bo C., Riso P., Zheng C., Shaposhnikov S., Collins A. Inter-laboratory variation in measurement of DNA damage by the alkaline comet assay in the hCOMET ring trial. *Mutagenesis*, **38**, 283–294 (2023). DOI: 10.1093/mutage/gead014
8. Owiti N. A., Kaushal S., Martin L., Sly J., Swartz C. D., Fowler J., Corrigan J. J., Recio L., and Engelward B. P. Using the hepaCometChip Assay for broad-spectrum DNA damage analysis. *Current Protocols*, **2**, e563 (2022). DOI: 10.1002/cpz1.563
9. Singh N. P., McCoy M. T., Tice R. R., and Schneider E. L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.*, **175** (1), 184–191 (1988). DOI: 10.1016/0014-4827(88)90265-0
10. Lafleur M. V., van Heuvel M., Woldhuis J., and Loman H. Alkali-labile sites and post-irradiation effects in single-stranded DNA induced by OH radicals. *Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med.*, **33** (3), 273–281 (1978). DOI: 10.1080/09553007814550151
11. Lafleur M. V., Woldhuis J., and Loman H. Alkali-labile sites and post-irradiation effects in gamma-irradiated biologically active double-stranded DNA in aqueous solu-

- tion. *Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med.*, **36** (3), 241–247 (1979). DOI: 10.1080/09553007914551011
12. Сирота Н. П. и Гапеев А. Б. *Набор и способ для приготовления многослойных агарозных блоков на поверхности мини-стекол для микроскопии*. Патент на изобретение RU 2558229 C2, 27.07.2015. Заявка № 2013117949/10 от 19.04.2013.
13. Kuznetsova E. A., Dyukina A. R., Chernigina I. A., and Sirota N. P. A method of low-temperature storing of agarose slides with lysed cells. *Bull. Exp. Biol. Med.*, **155** (6), 757–759 (2013). DOI: 10.1007/s10517-013-2245-7

Thermal Processes Associated with Electrophoresis under Conditions of High Ionic Strength

N.P. Sirota*, E.P. Khizhnyak*, L.N. Khizhnyak*, T.V. Sirota*, and E.A. Kuznetsova*

**Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, Russian Academy of Sciences, Institutskaya ul. 3, Pushchino, Moscow Region, 142290 Russia*

Temperature heterogeneity of the electrophoretic solution, dynamically changing during electrophoresis in the gel platform area, was demonstrated by us earlier. In order to understand the reasons for this effect, we used U-shaped inserts in the wells of the electrophoretic chamber, protruding above the surface of the electrophoretic solution, but not affecting the current flow. The conducted study showed that the migration of heated masses of solution is caused by different rates of hydrogen and oxygen production on platinum electrodes. Using technique of real-time thermal imaging, it was demonstrated that in the presence of U-shaped inserts, heating was uniform up to 7°C throughout the entire volume of the solution located above the gel platform. Heating of the liquid in the well area occurred with less dynamics and was not identical. The heating of the liquid in the cathode well occurs insignificantly (only 1.5°C), and at the anode the increase is 2.5°C. We believe that temperature homogeneity will be of significant importance for reducing the variability of the results obtained by the Comet assay (DNA comet) method on preparations subjected to alkaline electrophoresis.

Keywords: nucleoids, DNA comet, alkaline electrophoresis, IR termograms