

УДК 543.054, 543.062

© Д. Г. Петров, Е. Д. Макарова, Н. А. Корнева, А. С. Альдекеева, Н. Н. Князьков

ВОЗДЕЙСТВИЕ ПОЛЕЙ РАЗНОЙ ПРИРОДЫ НА ВЫХОД ДНК ПРИ ВЫДЕЛЕНИИ ИЗ МОДЕЛЬНЫХ РАСТВОРОВ НА ДВУОКСИ КРЕМНИЯ. 1. ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ

Изучено влияние температуры на выход ДНК *M. tuberculosis* при использовании модельных растворов и коммерческих силикатных микроколонок в интервале температур 20–90 °С. Показано, что величина выхода линейно зависит от температуры ($r = 0.990$) в диапазоне 20–70 °С с максимумом при 70 °С. Выход ДНК немного уменьшается при более высоких температурах. Максимальное значение выхода составляет 73 %, т. е. выделение ДНК на 50 % эффективнее, чем при комнатной температуре. Температура, при которой достигается максимальный выход, немного ниже температуры плавления ДНК (76 °С). На основе предположения, что полученные результаты обусловлены главным образом изменением вязкости при увеличении температуры, была оценена применимость диффузионных уравнений для объяснения линейной зависимости выхода от температуры. Значения, рассчитанные для системы ДНК—H₂O, немного завышены, но качественно согласуются с полученной экспериментально зависимостью выхода ДНК от температуры. В случае когда при моделировании вместо воды использовали некоторые растворы электролитов, рассчитанные значения соответствовали экспериментально полученной зависимости выхода ДНК от температуры вплоть до 70 °С. Проведено краткое обсуждение возможного влияния некоторых физико-химических и гидродинамических процессов, происходящих при пропускании жидкости через пористую двуокись кремния, а также рассмотрены некоторые побочные эффекты условий проведения эксперимента.

Кл. сл.: нуклеиновые кислоты, влияние температуры, выделение ДНК, очистка ДНК, концентрирование, диоксид кремния, двуокись кремния

ВВЕДЕНИЕ

Выделение и очитка нуклеиновых кислот (НК) является важным шагом пробоподготовки перед анализом генетического материала методами специфической индикации, позволяющими определить видовую принадлежность носителя данного материала. Результат анализа определяется степенью очистки, количеством и качеством выделенной НК, поэтому при разработке методов необходимо обеспечить максимальную эффективность процесса выделения, т. е. количество НК, пригодных для дальнейшего анализа.

Классификация различных методов выделения НК с обсуждением приоритетов требований, предъявляемых к методам, приведена в работе [1]. В часто используемых быстрых, надежных и простых методах выделения и очистки НК используется принцип твердофазной экстракции, основанный на способности НК адсорбироваться на поверхности кремнийсодержащих частиц — двуокиси кремния (SiO₂), диатомитов, стекловолна и т. д. [2, 3]. В настоящее время эти методы используются во многих коммерческих наборах и в автоматизированных системах.

Развитие этого принципа привело к официаль-

ному внедрению мембранных спин-колонок на основе SiO₂, принцип действия которых очень прост: ДНК связывается с мембраной из SiO₂ в присутствии высоких концентраций хаотропных солей, загрязнения вымываются, а ДНК элюируют из мембраны водой или низкосолевым буфером [4]. Этот принцип обеспечивает быстрый, удобный, нетоксичный метод с выходом чистой ДНК в интервале от 50 % до 75 %, причем методика, предположительно, работает лучше с фрагментами ДНК, большими, чем 500 пар оснований, поскольку некоторые более короткие фрагменты могут необратимо связываться с мембраной [4]. В то же время по данным работы [5] при элюировании с мини-колонок удаляется 90–95 % ДНК, а 5–10 % ДНК остаются в колонке в виде молекул ДНК и / или ДНК, включенных в состав частиц белков или фрагментов бактерий.

Связывание между ДНК и SiO₂ основано на экранированных межмолекулярных электростатических взаимодействиях, дегидратации поверхностей ДНК и SiO₂ и на формировании межмолекулярной водородной связи в контактном слое ДНК—SiO₂ [6]. Поэтому на величины адсорбции может влиять много факторов, таких как ионная сила, природа солей и буферных растворов, pH,

температура, размер и конформация ДНК, а также характеристики адсорбента — пористость, размер пор, плотность функциональных групп и т. д. [6, 7]. Влияние физико-химических характеристик растворов на адсорбцию в системе ДНК— SiO_2 в общем виде хорошо известно, и оптимизация условий проводится при разработке каждой конкретной методики (коммерческого набора), тогда как влияние на адсорбцию такого внешнего фактора, как температура, изучено мало, а имеющиеся сведения крайне противоречивы.

При изучении изотерм адсорбции сверхспирали ДНК pUC18 на частицах SiO_2 при 23 и 37 °C установлено, что реакция связывания ДНК в 6 М растворе перхлората является при pH 8 "немного эндотермической", при значениях pH 7 является атермической, а при pH ниже 7 — "слегка экзотермической" [6]. После изучения адсорбции ДНК, выделенной из тимуса телят, на морском песке аналитической степени чистоты при 3, 23, 37 и 50 °C авторами [8] сделан вывод, что между степенью адсорбции и температурой корреляции нет. Изучение адсорбции ДНК на диатомите в Zn-форме в диапазоне 5–35 °C показало, что адсорбция максимальна при 5 °C; при 15 и 25 °C адсорбция немного уменьшается и резко снижается при 35 °C [9].

При разработке микро-экстрактора ДНК определяли адсорбцию плацентарной ДНК на SiO_2 в интервале температур 25–70 °C в буфере в присутствии гуанидина хлорида [10]. Показано, что зависимость адсорбции от температуры имеет колоколообразную форму с максимумом при 50 °C; изменение адсорбции при изменениях температуры объясняли конформационными перестройками в молекуле ДНК [10]. (В целом эксперимент имел большие флуктуации результатов: значения отличались в среднем на 35 % от средних значений [10]).

Метод выделения ДНК с помощью магнитных частиц, покрытых SiO_2 , применен к фрагментам λ -бактериофага в диапазоне температур от 5 до 99 °C [11]. Наибольший выход получен при 20 °C. Наименьший выход ДНК наблюдали при 5 °C, затем выход увеличивался (с максимумом при 20 °C), после чего уменьшался вплоть до 60 °C и далее опять увеличивался при 99 °C (однако был меньше, чем при 20 °C).

В работе [12] со ссылкой на литературные данные сообщается, что оптимальными условиями для проведения сорбции ДНК являются высокая ионная сила раствора, значения pH в интервале 3.5–6.5 (оптимум pH 5) и температура выше 37 °C. Повышение температуры до 35 и иногда до 80 °C применяется в ВЭЖХ для улучшения массопереноса денатурированных олигонуклеотидов между стационарной и подвижной фазой, но имеет ограниченное применение в случае материалов на основе SiO_2 из-за растворения последней со временем [13].

Работ по систематическому исследованию температурных эффектов при динамическом режиме адсорбции ДНК на SiO_2 в широком интервале температур мы не обнаружили.

Целью данной работы является изучение влияния температуры на выход ДНК *M. tuberculosis* из модельных растворов при использовании микроколонок, разработанных в ЗАО "Синтол" (г. Москва), для того, чтобы оценить возможность практического использования температурных эффектов для увеличения выхода ДНК.

1. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

1.1. Материалы

Для приготовления модельных растворов ДНК использовали раствор ДНК *M. tuberculosis* концентрации $1 \cdot 10^7$ копий/мкл, входящий в состав коммерческого набора "Ампли-Туб-РВ" (ЗАО "Синтол").

Выделение ДНК *M. tuberculosis* проводили на микроколонках со стекловолоконной мембраной NucleoSpin (Macherey-nagel, США), входящих в состав набора "К-Сорб" (ЗАО "Синтол"). Характеристики сорбента производителем не сообщаются.

Рабочий модельный раствор концентрации $1 \cdot 10^5$ копий / мкл готовили методом последовательного разбавления, применяя для этой цели однократный ТЕ-буфер.

При количественном определении ДНК использовали реагенты, входящие в состав набора для проведения ПЦР-РВ "Ампли-Туб-РВ": праймеры, буфер, зонды, олигонуклеотиды, хлорид магния.

Все эти материалы были предоставлены нам ЗАО "Синтол" (Москва).

1.2. Оборудование

Для изучения воздействия температуры на эффективность выделения ДНК на стекловолоконной мембране применяли термостат "Гном" ("ДНК-Технология", Россия) и микроцентрифугувстряхиватель "Циклотемп-901" (ЦиклоТемп, Россия). Анализ результатов выделения ДНК проводили с помощью амплификатора нуклеиновых кислот "АНК-32" (ИАП РАН, Россия) [14]: прибор позволяет оценивать результаты амплификации одновременно из 32 проб. Режим работы (параметры амплификации) выбирали в соответствии с инструкцией к набору "Ампли-Туб-РВ".

1.3. Методика экспериментального исследования

Для приготовления исследуемых проб в 800 мкл лизирующего реагента (ЛР) добавляли 200 мкл

Табл. 1. Зависимость выхода ДНК от температуры $T_i, ^\circ\text{C}$: средние по n испытаниям ($n = 10$) значения величин выхода ДНК $\bar{Y}_i, \%$; выборочные стандартные отклонения s_r при различных температурах и относительное увеличение выхода ДНК по сравнению с выходом при $20 ^\circ\text{C}$ $\bar{Y}_i / \bar{Y}_{20^\circ\text{C}}$

Характеристика выхода ДНК	Значения температуры $T_i, ^\circ\text{C}$							
	20	30	40	50	60	70	80	90
$\bar{Y}_i, \%$	48.3	50.4	57.9	61.7	65.3	72.8	69.2	62.4
s_r	5.5	5.2	4.1	3.6	6.5	4.8	5.4	3.3
$s_r, \%$	11.4	10.2	7.0	5.8	9.9	6.6	7.9	5.3
$\bar{Y}_i / \bar{Y}_{20^\circ\text{C}}$	1.00	1.04	1.20	1.28	1.35	1.51	1.43	1.29

рабочего раствора ДНК и перемешивали с помощью микроцентрифуги-встряхивателя "Цикло-темп-901". (ЛР предназначен в общем случае для проведения лизиса клеточного материала, а также для создания оптимальных условий при последующей сорбции ДНК на микроколонке).

Таким образом, концентрация ДНК в растворе, пропускаемом через миниколонку, составляла $2 \cdot 10^4$ копий/мкл. (В каждую партию растворов при выделении ДНК включали отрицательный контроль выделения, что позволяло оценить возможность загрязнения на этапе выделения).

При изучении влияния температуры на выход ДНК пробирку Эппендорф, содержащую 1 мл пробы, и микроколонку помещали в термостат и выдерживали при каждой температуре 3–5 мин, контролируя достижение заданной температуры в пробе. Температуру изменяли в диапазоне $20 \div 90 (\pm 2) ^\circ\text{C}$ с шагом $10 ^\circ\text{C}$; при каждой температуре проводили 10 параллельных опытов ($n = 10$). Точность поддержания температуры в термостате составляет $\pm 0.5 ^\circ\text{C}$.

Тотчас после достижения нужной температуры микроколонку помещали в штатив, пробу (1 мл) отбирали из пробирки инсулиновым шприцем (без иглы) и плавно выдавливали в микроколонку в течение 1 мин, следя за тем, чтобы все содержимое шприца прошло через микроколонку. (Для каждого опыта использовали новый шприц).

На следующем этапе в колонку вводили 500 мкл раствора для промывания (ПР-А) и центрифугировали в течение 1 мин при 4000 об./мин. Повторяли эту процедуру еще 2 раза, используя растворы ПР-В и ПР-С. После стадии промывания микроколонки с открытой крышкой помещали в термостат и выдерживали в течение 5 мин при температуре $70 ^\circ\text{C}$

для удаления остатков промывающего раствора.

Для десорбции ДНК добавляли в микроколонку 200 мкл элюирующего раствора (ЭР), предварительно нагретого до $65 ^\circ\text{C}$, пропускали ЭР через колонку в течение ~ 15 с и центрифугировали в течение 1 мин при 4000 об./мин.

Все стадии, за исключением первой, выполняли в соответствии с рекомендациями производителя набора "К-Сорб". (Используемые растворы входят в состав набора "К-Сорб"; компоненты растворов производителем не сообщаются).

Для определения концентрации ДНК отбирали по 10 мкл раствора, полученного при элюировании ДНК, и проводили анализ методом ПЦР-РВ с использованием калибровочных образцов на приборе АНК-32, дублируя проведение анализа для повышения достоверности.

2. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

2.1. Влияние температуры на выход ДНК при сорбции на микроколонках

Средние значения величин выхода ДНК ($\bar{Y}, \%$) и выборочное стандартное отклонение для каждой серии опытов при различных температурах приведены в табл. 1. Здесь и далее: $\bar{Y}_i = (\bar{c}_i / c_o) \cdot 100$; c_o — исходная концентрация ДНК в растворе; $\bar{c}_i$ — средняя концентрация ДНК в растворе после завершения цикла сорбции и элюирования, рассчитанная по результатам параллельных измерений.

К $\bar{Y}, \%$ относится из приведенных данных, условия воспроизведения опытов — приемлемые, несмотря на то, что нагревание растворов и микроколонок

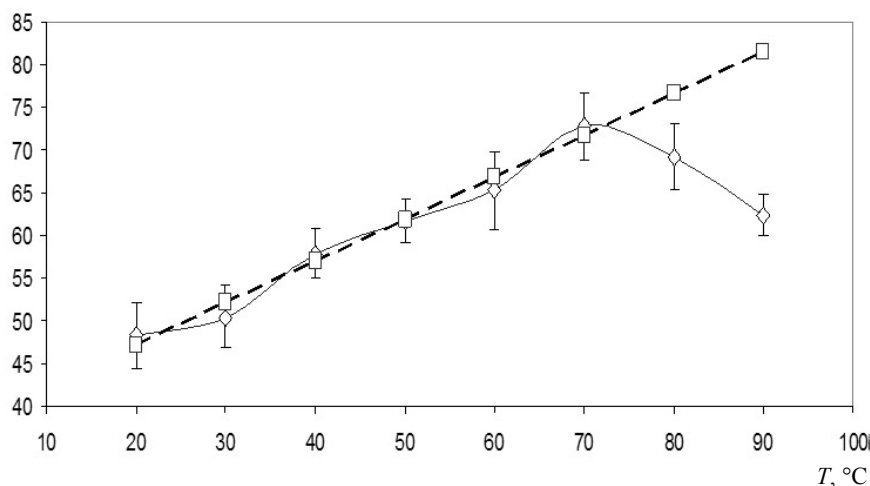


Рис. 1. Зависимость величин выхода ДНК от температуры при сорбции на микроколонке.

◇ — средние значения, полученные в эксперименте;

□ — значения, рассчитанные по уравнению регрессии (пояснения в тексте)

при каждой температуре проводили отдельно в термостате перед стадией сорбции ДНК.

На рис. 1 представлен график зависимости средних значений выхода ДНК при сорбции на микроколонке от температуры с доверительными интервалами ($P=0.95, f=9$). В диапазоне температур 20–70 °C изменение средних значений выхода ДНК при повышении температуры может быть аппроксимировано линейной зависимостью $\bar{Y} = 37.4 + 0.49 \cdot T$, $s_0 = 1.4$ ($r = 0.990$). При дальнейшем увеличении температуры выход ДНК несколько уменьшается. В то же время сравнение средних значений показало, что при переходе от 70 до 80 °C разница между величинами выхода ДНК является незначимой, тогда как увеличение температуры от 80 до 90 °C приводит к уменьшению выхода ДНК.

Таким образом, увеличение температуры на стадии сорбции до 70 °C позволяет увеличить выход ДНК в 1.5 раза по сравнению с сорбцией при комнатной температуре. Некоторое уменьшение величины сорбции при увеличении температуры выше 70 °C может объясняться конформационными изменениями молекул ДНК: экспериментальное определение кривых плавления *M. tuberculosis* ДНК с помощью прибора АНК-32 показало, что температура плавления (T_m) изученных образцов составляет 76 °C.

Наблюдаемое увеличение выхода ДНК при повышении температуры качественно согласуется с результатами работы [10], свидетельствующими о непрерывном росте адсорбции при увеличении температуры вплоть до достижения температуры максимального выхода, несмотря на разные режимы адсорбции (статический в работе [10] и динамический в нашем случае). Однако температура, при которой наблюдается максимальный выход

ДНК, несколько отличается (50–55 °C по данным [10]). Кроме того, значительно меньшие относительные стандартные отклонения (по сравнению с большим разбросом результатов в работе [10]) позволили установить линейный характер зависимости выхода ДНК от температуры.

Влияние некоторых физических и физико-химических параметров, которые могут влиять на сорбцию ДНК при нормальных условиях и повышенных температурах, рассмотрены в следующем разделе.

2.2. Влияние физических и физико-химических параметров на сорбцию ДНК

На характер зависимости адсорбции ДНК от температуры может влиять множество факторов: скорость потока, свойства поверхности адсорбента, природа связей между ДНК и адсорбентом, конформация и размер молекул ДНК, концентрация ДНК в растворе, состав и ионная сила раствора и т. д.

Экспериментальное изучение адсорбции ДНК показало, что при адсорбции ДНК на межфазной поверхности (твердое тело / жидкость) начальная стадия адсорбции контролируется процессом диффузии, стационарные значения достигаются после 6 ч [15]. По данным работы [16] степень адсорбции ДНК на стеклянных слайдах в статических условиях увеличивалась с увеличением времени адсорбции, выходила на плато через 20–30 мин и достигала более 85 %.

Характер математического описания процесса диффузии зависит от физической модели процесса [17]. В нашем случае время контакта порций раствора с элементом поверхности мало, и на каждом новом элементе поверхности концентрация

Табл. 2. Значения динамической вязкости μ для воды [21], 20 % раствора KCl, 30 % раствора NH_4NO_3 [22] и относительные значения динамической вязкости $\mu_{20^\circ\text{C}} / \mu_T$, при разной температуре T

Моделируемая среда	$T, ^\circ\text{C}$							
	20	30	40	50	60	70	80	90
$\mu, [21]$								
H_2O	1.005	0.8007	0.6560	0.5494	0.4688	0.4061	0.3565	0.3165
20 % KCl	1.02	0.85	0.72	0.62	0.54	0.49	0.44	—
30 % NH_4NO_3	1.00	0.84	0.73	0.64	0.57	—	—	—
$\mu_{20^\circ\text{C}} / \mu_T$								
H_2O	1.00	1.26	1.53	1.83	2.14	2.47	2.82	3.18
20 % KCl	1.00	1.20	1.42	1.64	1.89	2.08	2.32	—
20 % NH_4NO_3	1.00	1.19	1.37	1.56	1.70	—	—	—

растворенного вещества резко повышается в процессе продавливания раствора ДНК. Поэтому можно предположить, что результаты эксперимента соответствуют случаю нестационарной диффузии через полубесконечный слой. В соответствии с этой моделью одномерный поток растворенного вещества j через единицу межфазной поверхности в течение короткого времени контакта фаз определяется $j = c_0 \sqrt{Dt / \pi}$ (осложняющие взаимодействия отсутствуют; c_0 — концентрация растворенного вещества на межфазной границе; D — коэффициент диффузии молекул ДНК; t — время) [17, 18].

Общее количество продиффундировавшего вещества $\bar{Q}(t)$ с начала процесса до момента времени t равно [18]

$$\bar{Q}(t) = 2c_0 \sqrt{Dt / \pi}. \quad (1)$$

Предполагая, что взаимодействие молекул ДНК с поверхностными центрами сорбции происходит немедленно и что распределение молекул внутри пор однородно, для описания быстрой стадии адсорбции, лимитируемой диффузией, при вводе раствора ДНК в пористый канал, авторы [19] предложили ввести в правую часть уравнения (1) коэффициент $k = S_{\text{in}} / S_{\text{ps}}$, учитывающий характеристики пористой среды. (S_{in} — площадь пор на входе, S_{ps} — общая внутренняя поверхность одиночной поры).

Однако, в отличие от абсолютных значений количества сорбировавшегося вещества, относи-

тельные количества вещества, доставляемого на поверхность при разных температурах M_{T_2} / M_{T_1} , определяются только отношением коэффициентов диффузии в случае постоянства условий на границе раствора и пористой среды, т. е. для полученных экспериментальных данных можно записать:

$$M_T / M_{20^\circ\text{C}} = \sqrt{D_T / D_{20^\circ\text{C}}}, \quad (2)$$

где D_T и $D_{20^\circ\text{C}}$ — коэффициенты диффузии при повышенной и комнатной температуре соответственно.

Коэффициент диффузии молекул в водных растворах должен увеличиваться при увеличении температуры от $T_1 = 20^\circ\text{C}$ до температуры $T_2 > 20^\circ\text{C}$ [20]:

$$\frac{D_T}{D_{20^\circ\text{C}}} = \frac{T_2}{T_1 = 293} \cdot \frac{\mu_{20^\circ\text{C}}}{\mu_T}, \quad (3)$$

где T_2 и T_1 — абсолютные температуры ($^\circ\text{K}$); μ_T , $\mu_{20^\circ\text{C}}$ — динамические коэффициенты вязкости растворителя при этих же температурах.

Поскольку состав лизирующего буфера производителями набора не сообщается, оценить изменение вязкости при разных температурах можно только приблизительно. При сорбции ДНК на SiO_2 часто применяются концентрированные растворы хаотропных солей, поэтому для расчетов мы использовали табулированные значения [21, 22] динамической вязкости воды, 20 %-х растворов хлористого калия и 30 %-х растворов азотнокислого аммония. Абсолютные и относительные значения вязкости для исследованного диапазона температур приведены в табл. 2.

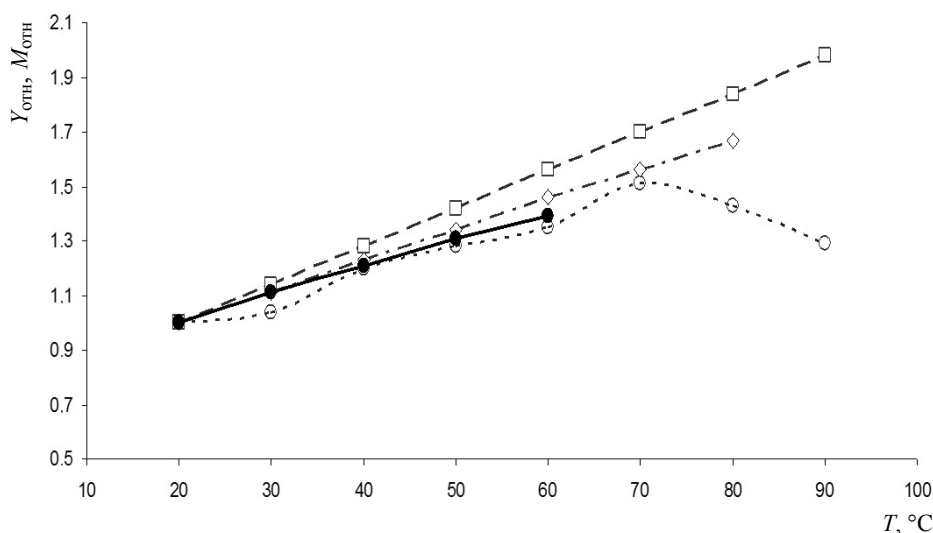


Рис. 2. Относительные значения $M_{отн} = M_T / M_{20^{\circ}\text{C}}$, рассчитанные для разных температур в разных моделируемых средах, и сопоставление этих значений с величинами относительного выхода ДНК, определенного экспериментально $Y_{отн} = \bar{Y}_i / \bar{Y}_{20^{\circ}\text{C}}$.

Моделируемые среды:

□ — H₂O; ◇ — 20 % раствор KCl; ● — 30% раствор NH₄NO₃; ○ — средние значения выхода ДНК, полученные экспериментально

Из данных, приведенных в табл. 2, видно, что вязкость растворителя уменьшается с ростом температуры, но степень этого изменения зависит от состава раствора.

Относительные значения $M_T / M_{20^{\circ}\text{C}}$, рассчитанные для разных температур по уравнению (2), и величины относительного выхода ДНК ($\bar{Y}_i / \bar{Y}_{20^{\circ}\text{C}}$) представлены на рис. 2. Результаты расчетов достаточно хорошо согласуются с экспериментальными данными по зависимости увеличения выхода ДНК от температуры: отклонения вплоть до температуры 70 °C составляют 6÷14 % в случае воды, 2÷8 % для растворов хлористого калия и 1÷4 % для растворов азотнокислого аммония.

Экспериментально определенное уменьшение величины выхода при температурах, превышающих температуру плавления, может быть обусловлено рядом эффектов, связанных как со свойствами самих молекул ДНК, так и со свойствами адсорбента.

Влияние температуры на состояние ДНК

При образовании одонитевых "растянутых" структур при температурах $T > T_m$ может быть заблокирована часть активных центров поверхности и / или возможна необратимая сорбция внутри пор мембраны. В работе [23] показано, что когда температура раствора приближается к T_m , двухспиральная молекула ДНК находится на пределе стабильности, так что даже маленькая сила может привести к ее плавлению. Модель [23] предсказывает, что при $T < T_m$ сила, вызывающая "перерастяжение" молекул, $f_{ov}(T)$, уменьшается почти линейно при увеличении температуры: если при 20 °C

переход в одонитевую структуру происходит под действием силы 65 пН, то при температурах 80 и 90 °C для этого требуются силы всего ~25 пН и ~10 пН соответственно.

Поэтому можно ожидать, что и разрушение части молекул (фрагментация) ДНК при $T > T_m$ будет происходить при значительно более низких значениях скорости сдвига (по сравнению с 20 °C). Соответственно наблюдаемое в эксперименте уменьшение выхода ДНК может быть связано с образованием меньших по размерам фрагментов молекул, которые или не определяются при анализе методом ПЦР-РВ, или не элюируются из колонки при условиях эксперимента.

Этот вопрос требует отдельного изучения, т. к. степень разрушения молекул ДНК в зависимости от скорости сдвига зависит от множества факторов: природы и концентрации ДНК, вязкости раствора, размеров каналов / пор, ионной силы и других параметров изучаемых систем.

Если в сорбирующей мембране существуют мелкие поры, транспорт молекул ДНК через эти поры может происходить по "snake-like"-механизму движения [24] под действием давления, сопровождающегося полной или частичной блокировкой части этих пор и уменьшением выхода ДНК при фильтрации. Можно предположить, что увеличение температуры выше T_m , приводящее к уменьшению вязкости раствора ДНК и увеличению коэффициента диффузии молекул, будет способствовать этому процессу.

Кроме того, в сдвиговых потоках возможно образование мультимерных форм сцепленных молекул, появление которых индуцируется и регулируется величиной скорости сдвига. В интервале температур $45 < T < 70$ °C, согласно [25], такое сцеп-

ление обратимо и существует в течение короткого промежутка времени; в присутствии ионов Mg^{2+} сдвиговый поток приводит к увеличению степени агрегирования, но результирующее состояние ансамблей молекул зависит также от ионной силы растворов. В работе [26] показано, что при температурах, равных или превышающих T_m , например при $T \geq 80-85^\circ C$, плазмидные ДНК образуют глобулы с типичной фрактальной структурой.

Все эти структурные изменения в процессе сорбции при повышенных температурах могут приводить к увеличению количества сорбированных молекул и одновременно к уменьшению выхода при элюировании, особенно после обработки спиртовыми растворами при промывании.

Влияние свойств пористого сорбента

При обсуждении влияния температуры на процесс сорбции следует отметить и возможное изменение свойств сорбента, в частности изменение величины дзета-потенциала (ζ) при увеличении температуры. Степень экспериментально регистрируемых изменений по данным разных авторов различна для разных систем на основе SiO_2 , но во всех случаях результаты свидетельствуют об увеличении отрицательного заряда поверхности при повышении температуры — как в микрокапиллярах, так и в случае суспензий SiO_2 [27, 28]. (По данным работы [27] значения дзета-потенциала при температурах 10 и $35^\circ C$ отличаются незначительно, но сильно изменяются при $75^\circ C$ в диапазоне pH 6–7). Как указано в обзоре [29], характер зависимости ζ от температуры определяется состоянием силанольных групп, адсорбционным равновесием и толщиной диффузного двойного слоя. В микрофлюидных системах величина дзета-потенциала SiO_2 увеличивается примерно на 1.75 % при увеличении температуры на $1^\circ C$, причем даже небольшие изменения температуры ($5-10^\circ C$) сильно влияют на его величину [29]. Таким образом, ионная сила растворов при выделении ДНК на SiO_2 будет сильно влиять на величину отрицательного заряда поверхности. Адсорбция макромолекул может еще больше сдвигать величину ζ в сторону отрицательных значений при повышении температуры, как это было показано в случае адсорбции ионизированного поливинилового спирта на частицах SiO_2 в 0.01 M NaCl [30].

Присутствие двойного электрического слоя на границе твердой и жидкой фаз приводит к появлению электро-вязкостного эффекта при протекании жидкости через микроканалы под действием давления: возникающий потенциал течения проявляется как поток жидкости, направленный противоположно потоку, создаваемому давлением [31, 32]. Потенциал течения пропорционален величине ζ -потенциала и перепаду давления и зависит от скорости течения раствора [31]. Это приводит

в общем случае к нарушению пуазейлевского течения, а в нашем случае могло бы, по-видимому, обеспечить перемешивание в пористой среде. Однако величина эффекта зависит от материала, размера и формы каналов и ионной силы растворов [31, 32].

Наконец еще одним важным фактором, который может влиять на сорбцию при повышенных температурах, является возможное растворение поверхностных слоев SiO_2 . Расчеты, выполненные по приведенной в работе [27] зависимости растворимости кристаллического кварца от температуры, показывают, что растворимость может увеличиться примерно в 3, 4 и 5 раз при увеличении температуры до 70, 80 и $90^\circ C$ соответственно по сравнению с растворимостью при $25^\circ C$. Скорость растворения аморфной SiO_2 в деионизованной воде при значениях pH, близких к нейтральным, в 10 раз быстрее по сравнению с кварцем и увеличивается при повышении температуры; при введении ионов Na^+ (0.05 M) растворение происходит еще быстрее (в 21 раз) [33]. По данным работы [34] с увеличением температуры до $100^\circ C$ в присутствии хлоридов Na^+ , K^+ , Li^+ и Mg^{2+} скорость растворения кварца в протоке увеличивается на полтора порядка.

Очень быстрое растворение, наблюдаемое при значениях pH, близких к нейтральным, в случае мезопористых структур SiO_2 , авторы [35] объясняют большой площадью поверхности и специфической структурой пор, выпуклая поверхность которых с малым радиусом кривизны обеспечивает высокую активность аморфной двуокиси кремния.

Такая повышенная растворимость в присутствии электролитов и в результате воздействия температуры объясняется реакциями гидролиза с разрывом мостиковых связей Si–O, что сопровождается образованием новых поверхностных Si–OH групп и/или молекулярной кремниевой кислоты [27, 36, 37]. Механизм этих процессов до сих пор точно неизвестен [37], но вполне возможно, что конкуренция этих процессов может вносить некоторый вклад как в увеличение степени сорбции при повышении температуры, так и в ее уменьшение при достижении некоторых критических условий.

Кроме того, транспорт растворенных веществ в пористой среде при стационарном проточном режиме может зависеть от содержания и состояния воды в твердой фазе. В работе [38] показано, что значительные отклонения от диффузионного режима по закону Фика могут происходить при уменьшении содержания воды в твердой фазе: при содержании воды $\geq 23\%$ (по объему) условия транспорта ближе к режиму фиковской диффузии, а при уменьшении содержания воды отклонения от диффузионного режима нарастают пропорционально уменьшению влагосодержания твердой фазы.

В нашем случае при проведении эксперимента как исследуемые пробы, так и микроколоники выдерживались в термостате до достижения заданной температуры, и, следовательно, нельзя исключить возможность изменения содержания и состояния воды на поверхности сорбента при температурах 80 и 90 °С. Уменьшение скорости массопереноса в этом случае может объяснить расхождение экспериментальных и расчетных результатов.

В отличие от рассмотренных выше объективных закономерностей, еще одной причиной наблюдаемого уменьшения выхода ДНК при температурах >70 °С может быть разъединение стадий нагревания пробы и микроколоники и самого процесса сорбции. Перенос и забор проб в шприц, установка микроколонок в штатив происходили при комнатной температуре и требовали некоторого времени, поэтому вполне вероятно некоторое охлаждение исследуемой системы до начала пропускания пробы через микроколонику.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучение влияния температуры на выход ДНК *M. tuberculosis* при использовании модельных растворов и коммерческих силикатных микроколонок в интервале температур 20–90 °С показало, что величина выхода линейно зависит от температуры ($r = 0.990$) в диапазоне 20–70 °С с максимумом при 70 °С. При более высоких температурах выход ДНК немного уменьшается. Максимальное значение выхода составляет 73 %, т. е. выделение ДНК в 1.5 раза эффективнее, чем при комнатной температуре. Температура, при которой достигается максимальный выход, немного ниже температуры плавления ДНК (76 °С).

На основе предположения, что полученные результаты обусловлены главным образом изменением вязкости при увеличении температуры, была оценена применимость диффузионных уравнений для объяснения линейной зависимости выхода от температуры. Значения, рассчитанные для системы ДНК—H₂O, немного завышены, но качественно согласуются с полученной экспериментально зависимостью выхода ДНК от температуры. В случае, когда при моделировании вместо воды использовали некоторые растворы электролитов, рассчитанные значения соответствовали экспериментально полученной зависимости выхода ДНК от температуры вплоть до 70 °С.

Рассмотрено возможное влияние изменений состояния молекул ДНК и пористого сорбента на процессы сорбции при повышенных температурах. Даже далеко не исчерпывающий анализ возможного влияния разных факторов показывает, что в процедуру выделения ДНК может быть вовлечено множество параллельно протекающих

и / или конкурирующих процессов, влияющих на конечный результат.

Поэтому, несмотря на хорошее совпадение экспериментальных данных и рассчитанных в модельном эксперименте в диапазоне температур 20–70 °С, выявление основных факторов, влияющих на выход ДНК при повышенных температурах, требует проведения опытов с хорошо охарактеризованными системами и контролем изменения свойств этих систем на каждой стадии процесса выделения ДНК.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Антонова О.С., Корнева Ю.В., Белов Ю.В., Курочкин В.Е. Эффективные методы выделения нуклеиновых кислот для проведения анализов в молекулярной биологии (Обзор) // Научное приборостроение. 2010. Т. 20, № 1. С. 3–9.
2. Boom R., Sol C.J.A., Salimans M.M.M. et al. Rapid and simple method for purification of nucleic acids // J. Clinical Microbiology. 1990. Vol. 28, No. 3. P. 495–503.
3. Herzer S. DNA purification // molecular biology problem solver: a laboratory guide / Ed. A.S. Gerstein. Wiley-Liss., Inc., 2001. P. 167–193.
4. Silica membrane spin columns: nucleic acid isolation // Biopolymer Isolation Technologies, LLC. URL: (www.bpi-tech.com).
5. Esser K.-H., Marx W.H., Lisowsky T. MaxXbond: first regeneration system for DNA binding silica matrices // Nature Methods. 2006. Application Notes. P. I–II.
6. Melzak K.A., Sherwood C.S., Turner R.F.B., Haynes C.A. Driving forces for DNA adsorption to silica in perchlorate solutions // J. Colloid Interface Science. 1996. Vol. 181. P. 635–644.
7. Vandeventer P.E., Lin J.S., Zwang T.J., et al. Multiphasic dna adsorption to silica surfaces under varying buffer, pH, and ionic strength conditions // J. Phys. Chem. B. 2012. Vol. 116, No. 19. P. 5661–5670. (Author manuscript).
8. Lorenz M.G., Wackernagel W. Adsorption of DNA to sand and variable degradation rates of adsorbed DNA // Applied and Environmental Microbiology. 1987. Vol. 53, No. 12. P. 2948–2952.
9. Tozak K.Ö., Erzenegin M., Sargin İ., Ünlü N. Sorption of DNA by diatomite-Zn (II) embedded supermacroporous monolithic P (HEMA) Cryogels // EXCLI Journal. 2013. Vol. 12. P. 670–678.
10. Enping H., Kiat H.C., Samper V. et al. Dependence of DNA adsorption to silicon dioxide on incubation temperature and time. 2002. URL: (staff.science.nus.edu.sg).
11. Smerkova K., Dostalova S., Vaculovicova M. et al. Investigation of interaction between magnetic silica particles and lambda phage DNA fragment // Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2013. Vol. 86. P. 65–72.
12. Ведерников В.Е. Сравнительные характеристики способов экстракции нуклеиновых кислот // Лаборатория. 2012. № 4. С. 14–15.

13. *Massi J., Lloyd L.* Use temperature to enhance oligonucleotide mass transfer and improve resolution in ion-pair RP HPLC. Application Note. Agilent Technologies, Inc., 2011. (3 pages).
14. *Алексеев Я.И., Белов Ю.В., Варламов Д.А. и др.* Приборы для диагностики биологических объектов на основе метода полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) // Научное приборостроение. 2006. Т. 16, № 3. С. 132–136.
15. *Mitra A., Chakraborty P., Chatteraj D.K.* Kinetics of adsorption of DNA at solid-liquid interfaces // *J. Indian Chem. Soc.* 2001. Vol. 78, no. 10–12. P. 689–696.
16. *Nanassy O.Z., Haydock P.V., Reed M.W.* Capture of genomic DNA on glass microscope slides // *Anal. Biochem.* 2007. Vol. 365, No. 2. P. 240–245. (Author Manuscript).
17. *Cussler E.L.* Diffusion: mass transfer in fluid systems. Cambridge University Press, 1997. 580 p.
18. *Николаев Н.И.* Диффузия в мембранах. М.: Химия, 1980. 232 с.
19. *Wei X., Mares J.W., Gao Y. et al.* Biomolecular kinetics measurements in flow cell integrated porous silicon waveguides // *Biomedical Optic Express*. 2012. Vol. 3, No. 9. P. 1993–2003.
20. *Бретишайдер С.* Свойства газов и жидкостей. Инженерные методы расчета / Пер. с польского под ред. Романкова П.Г. М.—Л.: Химия, 1966. 535 с.
21. *Справочник химика. 2-е изд. Т. I / Под ред. Б.П. Никольского.* М.—Л.: ГХИ, 1962. 1167 с. (С. 985–986).
22. *Справочник химика. 2-е изд. Т. III.* М.—Л.: Химия, 1964. (С. 715, 718).
23. *Rouzina I., Bloomfeld V.A.* Force-induced melting of the DNA double helix. 2. Effect of solution conditions // *Biophysical J.* 2001. Vol. 80, No. 2. P. 894–900.
24. *Arkhangelsy E., Sefi Y., Hajaj B. et al.* Kinetics and mechanism of plasmid DNA penetration through nanopores // *J. Membrane Science*. 2011. Vol. 371. P. 45–51.
25. *Haber C., Wirtz D.* Shear-induced assembly of λ -phage DNA // *Biophysical J.* 2000. Vol. 79, No. 3. P. 1530–1536.
26. *Yan L., Iwasaki H.* Fractal aggregation of DNA after thermal denaturation // *Chaos, Solitons and Fractals*. 2004. Vol. 20. P. 877–881.
27. *Ramachandran R., Somasundaran P.* Effect of temperature on the interfacial properties of silicates // *Colloids and Surfaces*. 1986. Vol. 21. P. 355–369.
28. *Evenhuis C.J., Guijt R.M., Macka M. et al.* Variation of zeta-potential with temperature in fused-silica capillaries used for capillary electrophoresis // *Electrophoresis*. 2006. Vol. 27. P. 672–676.
29. *Kirby B.J., Hasselbrink E.F., jr.* Zeta potential of microfluidic substrates: 1. Theory, experimental techniques, and effects on separations // *Electrophoresis*. 2004. Vol. 25. P. 187–202.
30. *Wiśniewska M.* The temperature effect on electrokinetic properties of the silica-polyvinyl alcohol (PVA) system // *Colloid Polym. Sci.* 2011. Vol. 289. P. 341–344.
31. *Ren L., Qu W., Li D.* Interfacial electrokinetic effects on liquid flow in microchannels // *International J. Heat Mass Transfer*. 2001. Vol. 44. P. 3125–3134.
32. *Zhou X., Herold K.E.* Streaming potential effects in flows on bio-chips // 2003 Summer Bioengineering Conference, July 25–29, Sonesta Beach Resort in Key Biscayne, Florida. P. #0605. (2 pages).
33. *Isehower J.P., Dove P.M.* The dissolution kinetics of amorphous silica into sodium chloride solutions: Effect of temperature and ionic strength // *Geochimica et Cosmochimica Acta*. 2000. Vol. 64, No. 24. P. 4193–4203.
34. *Grerar D.A., Dove P.M.* Kinetics of quartz dissolution in electrolyte solutions using a hydrothermal mixed flow reactor // *Geochemistry of the Earth's Surface and of Mineral Formation*, 2nd International Symposium, July, 2–8. 1990. Aix en Provence, France. P. 301.
35. *Le-Tuan Pham A., Sedlak D.L., Doyle F.M.* Dissolution of mesoporous silica supports in aqueous solutions: Implications for mesoporous silica-based water treatment processes // *Applied Catalysis B: Environmental*. 2012. P. 258–264.
36. *Dewan S., Yeganeh M.S., Borguet E.* Experimental correlation between interfacial water structure and mineral reactivity // *J. Phys. Chem. Lett.* 2013. Vol. 4. P. 1977–1982.
37. *Zhang S., Liu Y.* Molecular-level mechanisms of quartz dissolution under neutral and alkaline conditions in the presence of electrolytes // *Geochemical Journal*. 2014. Vol. 48. P. 189–205.
38. *Padilla I.Y., Jim Yeh T.-C., Conklin M.H.* The effect of water content on solute transport in unsaturated porous media // *Water Resources Research*. 1999. Vol. 35, No. 11. P. 3303–3313.

**Институт аналитического приборостроения РАН,
г. Санкт-Петербург**

Контакты: Петров Дмитрий Григорьевич,
Dimoon88@mail.ru

Материал поступил в редакцию: 16.04.2015

INFLUENCE OF DIFFERENT KIND EXTERNAL FIELDS ON DNA YIELD AT ISOLATION ON SILICA FROM MODEL SOLUTIONS.

1. EFFECT OF TEMPERATURE

D. G. Petrov, E. D. Makarova, N. A. Korneva, A. S. Aldekeeva, N. N. Knyazkov

Institute for Analytical Instrumentation of RAS, Saint-Petersburg, Russia

The temperature dependence of the *M. tuberculosis* DNA yield on commercial silica microcolumns from the model solutions in the range of 20 to 90 °C was studied. Linear yield-temperature relationship from 20°C up to 70 °C was revealed ($r = 0.990$), with maximum yield peaked at 70 °C. DNA yield show a slight decrease when heated at higher temperatures. The value of maximum yield is 73 %, i.e. DNA isolation is 50 % more efficient at 70 °C as against room temperature. The best DNA yield temperature is slightly below DNA melting temperature (76 °C). Assuming that the viscosity changes with temperature increase are mainly responsible for the observed data the applicability of diffusion equations was evaluated to account for the linear yield-temperature relationship. The calculated values are slightly overestimated but qualitatively agree well with experimental temperature dependence of DNA yield in case of DNA—H₂O system. The calculated data fit the experimental yield-temperature dependence well up to 70 °C with some electrolyte solutions in place of pure water in DNA solutions. The conceivable effects of some physico-chemical and hydrodynamic processes in the course of the liquid passage through porous silica are briefly touched along with something of side actions of the experimental conditions.

Keywords: nucleic acids, effect of temperature, DNA separation, DNA purification, DNA concentration, silica

REFERENCES

1. Antonova O.S., Korneva Yu.V., Belov Yu.V., Kurochkin V.E. [Effective methods of release of nucleic acids for carrying out analyses in molecular biology (Review)]. *Nauchnoe Priborostroenie* [Science Instrumentation], 2010, vol. 20, no. 1. pp. 3–9. (In Russ.).
2. Boom R., Sol C.J.A., Salimans M.M.M. et al. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J. Clinical Microbiology*, 1990, vol. 28, no. 3, pp. 495–503.
3. Herzer S. DNA purification. *Molecular biology problem solver: a laboratory guide*. Ed. A.S. Gerstein. Willey-Liss., Inc., 2001, pp. 167–193.
4. Silica membrane spin columns: nucleic acid isolation. Biopolymer Isolation Technologies, LLC. URL: (www.bpi-tech.com).
5. Esser K.-H., Marx W.H., Lisowsky T. MaxXbond: first regeneration system for DNA binding silica matrices. *Nature Methods*, 2006, Application Notes, pp. I–II.
6. Melzak K.A., Sherwood C.S., Turner R.F.B., Haynes C.A. Driving forces for DNA adsorption to silica in perchlorate solutions. *J. Colloid Interface Science*, 1996, vol. 181, pp. 635–644.
7. Vandeventer P.E., Lin J.S., Zwang T.J., et al. Multi-phasic dna adsorption to silica surfaces under varying buffer, pH, and ionic strength conditions. *J. Phys. Chem. B*, 2012, vol. 116, no. 19, pp. 5661–5670. (Author manuscript).
8. Lorenz M.G., Wackernagel W. Adsorption of DNA to sand and variable degradation rates of adsorbed DNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 1987, vol. 53, no. 12, pp. 2948–2952.
9. Tozak K.Ö., Erzengin M., Sargin İ., Ünlü N. Sorption of DNA by diatomite-Zn (II) embedded supermacroporous monolithic P (HEMA) Cryogels. *EXCLI Journal*, 2013, vol. 12, pp. 670–678.
10. Enping H., Kiat H.C., Samper V. et al. *Dependence of DNA adsorption to silicon dioxide on incubation temperature and time*. 2002. URL: (staff.science.nus.edu.sg).
11. Smerkova K., Dostalova S., Vaculovicova M. et al. Investigation of interaction between magnetic silica particles and lambda phage DNA fragment. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2013, vol. 86, pp. 65–72.
12. Vedernikov V.E. [Comparative characteristics of ways of extraction of nucleic acids]. *Laboratoriya* [Laboratory], 2012, no. 4, pp. 14–15. (In Russ.).
13. Massi J., Lloyd L. *Use temperature to enhance oligo-nucleotide mass transfer and improve resolution in ion-pair RP HPLC*. Application Note, Agilent Technologies, Inc., 2011. (3 pages).
14. Alekseev Ya.I., Belov Yu.V., Varlamov D.A. et al. [Devices for diagnostics of biological objects on the basis of a method of polimerazny chain reaction in real time (PCR-RT)]. *Nauchnoe Priborostroenie* [Science Instrumentation], 2006, vol. 16, no. 3, pp. 132–136. (In Russ.).
15. Mitra A., Chakraborty P., Chattoraj D.K. Kinetics of adsorption of DNA at solid-liquid interfaces. *J. Indian*

- Chem. Soc.*, 2001, vol. 78, no. 10–12, pp. 689–696.
16. Nanassy O.Z., Haydock P.V., Reed M.W. Capture of genomic DNA on glass microscope slides. *Anal. Biochem.*, 2007, vol. 365, no. 2, pp. 240–245. (Author Manuscript).
 17. Cussler E.L. *Diffusion: mass transfer in fluid systems*. Cambridge University Press, 1997. 580 p.
 18. Nikolaev N.I. *Diffuziya v membranach* [Diffusion in membranes]. Moscow, Khimiya Publ., 1980. 232 p. (In Russ.).
 19. Wei X., Mares J.W., Gao Y. et al. Biomolecular kinetics measurements in flow cell integrated porous silicon waveguides. *Biomedical Optic Express.*, 2012, vol. 3, no. 9, pp. 1993–2003.
 20. Bretshnyder S. *Svoystva gazov i zhidkostey. Inzhenernyye metody rascheta. Per. s pol'skogo pod red. Romankova P.G.* [Properties of gases and liquids. Engineering methods of calculation. The translation with Polish, ed. Romankov P.G.], M.—L., Khimiya Publ., 1966. 535 p.
 21. Nikol'skiy B.P., ed. *Spravochnik khimika. 2-e izd. T. I.* [Reference book of the chemist. 2nd edit. Vol. I] M.—L. GChI Publ., 1962. 1167 p. (pp. 985–986). (In Russ.).
 22. *Spravochnik khimika. 2-e izd. T. III.* [Reference book of the chemist. 2nd edit. Vol. III] M.—L. Khimiya Publ., 1964. (pp. 715, 718). (In Russ.).
 23. Rouzina I., Bloomfield V.A. Force-induced melting of the DNA double helix. 2. Effect of solution conditions. *Biophysical J.*, 2001, vol. 80, no. 2, pp. 894–900.
 24. Arkhangelsy E., Sefi Y., Hajaj B. et al. Kinetics and mechanism of plasmid DNA penetration through nanopores. *J. Membrane Science*, 2011, vol. 371, pp. 45–51.
 25. Haber C., Wirtz D. Shear-induced assembly of λ -phage DNA. *Biophysical J.*, 2000, vol. 79, no. 3, pp. 1530–1536.
 26. Yan L., Iwasaki H. Fractal aggregation of DNA after thermal denaturation. *Chaos, Solitons and Fractals*, 2004, vol. 20, pp. 877–881.
 27. Ramachandran R., Somasundaran P. Effect of temperature on the interfacial properties of silicates. *Colloids and Surfaces*, 1986, vol. 21, pp. 355–369.
 28. Evenhuis C.J., Guijt R.M., Macka M. et al. Variation of zeta-potential with temperature in fused-silica capillaries used for capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 2006, vol. 27, pp. 672–676.
 29. Kirby B.J., Hasselbrink E.F., jr. Zeta potential of microfluidic substrates: 1. Theory, experimental techniques, and effects on separations. *Electrophoresis*, 2004, vol. 25, pp. 187–202.
 30. Wiśniewska M. The temperature effect on electrokinetic properties of the silica-polyvinyl alcohol (PVA) system. *Colloid Polym. Sci.*, 2011, vol. 289, pp. 341–344.
 31. Ren L., Qu W., Li D. Interfacial electrokinetic effects on liquid flow in microchannels. *International J. Heat Mass Transfer*, 2001, vol. 44, pp. 3125–3134.
 32. Zhou X., Herold K.E. Streaming potential effects in flows on bio-chips. *Summer Bioengineering Conference*, July 25–29, 2003, Sonesta Beach Resort in Key Biscayne, Florida. pp. #0605. (2 pages).
 33. Isenhowe J.P., Dove P.M. The dissolution kinetics of amorphous silica into sodium chloride solutions: Effect of temperature and ionic strength. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 2000, vol. 64, no. 24, pp. 4193–4203.
 34. Grerar D.A., Dove P.M. Kinetics of quartz dissolution in electrolyte solutions using a hydrothermal mixed flow reactor. *Geochemistry of the Earth's Surface and of Mineral Formation, 2nd International Symposium*, July, 2–8, 1990, Aix en Provence, France. pp. 301.
 35. Le-Tuan Pham A., Sedlak D.L., Doyle F.M. Dissolution of mesoporous silica supports in aqueous solutions: Implications for mesoporous silica-based water treatment processes. *Applied Catalysis B: Environmental*, 2012, pp. 258–264.
 36. Dewan S., Yeganeh M.S., Borguet E. Experimental correlation between interfacial water structure and mineral reactivity. *J. Phys. Chem. Lett.*, 2013, vol. 4, pp. 1977–1982.
 37. Zhang S., Liu Y. Molecular-level mechanisms of quartz dissolution under neutral and alkaline conditions in the presence of electrolytes. *Geochemical Journal*, 2014, vol. 48, pp. 189–205.
 38. Padilla I.Y., Jim Yeh T.-C., Conklin M.H. The effect of water content on solute transport in unsaturated porous media. *Water Resources Research*, 1999, vol. 35, no. 11, pp. 3303–3313.

Contacts: Petrov Dmitriy Grigor'evich,
Dimoon88@mail.ru

Article received in edition: 16.04.2015