
**МАТЕМАТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ
И МОДЕЛИРОВАНИЕ В ПРИБОРОСТРОЕНИИ**

УДК 543.426; 543.9

© Д. А. Белов, Ю. В. Белов, В. Е. Курочкин

**НОВАЯ МЕТОДИКА ОБРАБОТКИ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО
ОТКЛИКА ПЛАВЛЕНИЯ ДНК**

В статье предложена усовершенствованная модель флуоресцентного отклика плавления ДНК. Модель основывается на степенном полиноме 3-го порядка (СП). На основе модели разработана методика обработки флуоресцентного отклика плавления ДНК, основным результатом применения которой является определение температуры плавления ДНК T_m . Новая методика целенаправленно позволяет сокращать время анализа за счет увеличения дискрета измерения температуры при одновременном сужении ее диапазона. Приведены доказательства адекватности модели на основе СП. Выполнено сравнение результатов применения разработанной и известной методик на основе сигмоидальной функции (СФ) при обработке реальных данных. Показана возможность использования методики для определения неравномерности распределения температуры держателя пробирок амплификатора в режиме плавления.

Кл. сл.: ДНК, ПЦР, анализатор нуклеиновых кислот, аппроксимация, метод плавления высокого разрешения

ВВЕДЕНИЕ

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) — экспериментальный метод молекулярной биологии, позволяющий добиться значительного увеличения малых концентраций определенных фрагментов нуклеиновой кислоты в пробе. Метод полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) позволяет провести качественный и количественный анализы пробы.

Разработкой и производством приборов для проведения анализов на основе метода ПЦР-РВ занимаются зарубежные фирмы: Agilent's Stratagene (США), Analytik Jena AG (Германия), Applied Biosystems (США), Bioer Technology (КНР), BioGene Limited (Англия), Bio-Rad Laboratories (США), Roche (США) и др., а также отечественные фирмы: ИАП РАН / МГТУ им. Баумана / ЗАО Синтол (Санкт-Петербург, Москва), Люмекс (Санкт-Петербург) и ДНК-технология (Москва). На большинстве приборов обеспечивается выполнение анализов на основе метода плавления ДНК.

Плавление ДНК (DNA melting) — процесс перехода двойной спирали молекулы ДНК в клубкообразное состояние при повышении температуры [1]. В результате анализа методом плавления получается S-образная кривая, специфичная для конкретного фрагмента ДНК и обладающая характерной точкой перегиба, которая соответствует температуре плавления ДНК (T_m) [2].

Значение T_m зависит от длины фрагмента ДНК,

процентного содержания суммы нуклеотидов С и G и других факторов [3–6].

Известна программа, позволяющая вычислить значение T_m с учетом содержания в растворе ДНК ионов Na^+ , K^+ , Mg^{++} и Tris^+ (буферного растворителя) [7].

Определение T_m необходимо для решения множества задач. Например, измерив температуру плавления, можно определить длину фрагмента ДНК, достоверно подтвердить специфичность ПЦР и оценить влияние примесей в пробе на амплификацию.

Фирма Karabiosystems (США) опубликовала краткое рекламное руководство [8] по использованию метода плавления высокого разрешения (High Resolution Melting Analysis, HRM, или HRMA), позволяющего исследователям обнаруживать и классифицировать генетические мутации, например однонуклеотидные полиморфизмы (single nucleotide polymorphisms, SNPs), выявлять новые гены и определять разновидности бактерий и вирусов. В этом руководстве указано, что при проведении анализа методом плавления высокого разрешения шаг изменения температуры не должен превышать 0.2 С. Высокое разрешение необходимо для уверенного определения малых изменений температуры плавления T_m : при замене одного нуклеотида различие T_m составляет 0.2–0.5 °С [2].

Однако при уменьшении шага значительно увеличивается время анализа, поскольку до получения отсчета интенсивности флуоресценции красителя при каждом шаге необходимо добиться точного установления температуры. При этом со-

крашается только погрешность дискретизации. Дополнительная погрешность измерения, обусловленная шумами, не может быть скомпенсирована.

В руководстве рекомендуется определять значение T_m как максимальное значение производной кривой плавления по температуре. Значения производной кривой плавления пропорциональны шагу изменения температуры, поэтому при уменьшении шага значительно уменьшается отношение сигнала к шуму.

На основании изложенного можно сделать вывод о том, что разработка методики обработки флуоресцентного отклика плавления для достижения высокого разрешения при изменении температуры с шагом 0.5 или 1 °С и уменьшения времени проведения анализа является актуальной задачей.

В статье [9] нами предложена методика обработки флуоресцентного отклика плавления, в которой используется модель кривой плавления на основе нелинейной сигмоидальной функции (СФ). Такая методика не имеет описанных недостатков: позволяет достигать параметров плавления высокого разрешения без дифференцирования кривой и уменьшать влияние шумов. Величина T_m вычисляется с дискретностью 0.1 или 0.01 °С. Методика на основе СФ также позволяет использовать уменьшенный диапазон измерения температур, что сокращает время проведения анализа [10]. При этом методика на основе СФ обладает следующим недостатком — требуется предварительное определение начальных значений параметров аппроксимирующей функции. Это приводит к плохой сходимости функции с экспериментальными данными. Для устранения этого недостатка в статье предложена новая методика обработки флуоресцентного отклика плавления ДНК на основе степенного полинома 3-го порядка (СП).

АНАЛИТИЧЕСКАЯ ФОРМА МОДЕЛИ СП

Модель кривой плавления на основе степенного полинома 3-го порядка предлагается выразить в виде формулы:

$$F_C = f_0 + f_1 \cdot T + f_2 \cdot T^2 + f_3 \cdot T^3, \quad (1)$$

где F_C — относительная величина интенсивности флуоресценции при температуре образца T (°С), f_0-f_3 — коэффициенты при степенных слагаемых полинома.

Для демонстрации особенностей модели кривой плавления и вычисления величины T_m будут использованы выражения первой и второй производных по температуре F_C' и F_C'' :

$$F_C' = f_1 + 2f_2 \cdot T + 3f_3 \cdot T^2, \quad (2)$$

$$F_C'' = 2f_2 + 6f_3 \cdot T. \quad (3)$$

УСЛОВИЯ ПОЛУЧЕНИЯ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО ОТКЛИКА ПЛАВЛЕНИЯ ДНК

Исходные ("сырые") данные кривой плавления ДНК для 8 проб в пробирках одного ряда получены на экспериментальном образце анализатора АНК-96, который в настоящее время разрабатывается в ИАП РАН. При этом был использован комплекс зонд—ДНК—мишень с флуорофором (ROX) в комбинации с гасителем производства ЗАО "СИНТОЛ" [11]. Параметры эксперимента: температура $T_{и}$ изменялась в диапазоне 77–85 °С с шагом 0.5 °С, длительность наблюдения флуоресценции при каждом шаге — 60 с, общее время эксперимента — 18 мин.

МЕТОДИКА ОПТИМИЗАЦИИ ПАРАМЕТРОВ МОДЕЛИ СП

В столбце 1 табл. 1 приведены значения температуры $T_{и}$ в диапазоне от 77 до 85 °С.

В столбце 3 — экспериментально полученные при этих температурах значения относительной интенсивности флуоресценции F для одной из проб.

Табл. 1. Результаты минимизации величины S для одной из проб

$T_{и}, ^\circ\text{C}$	$T_p, ^\circ\text{C}$	F	F_C	D_C	S
1	2	3	4	5	6
77	0	518	527.30	86.42	16838.2
⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	
77.5	0.5	517	521.77	22.75	
⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	
85	8	937	923.54	181.24	

В столбце 2 табл. 1 приведены расчетные значения температуры T_p , вычисленные по формуле

$$T_p = T_{и} - T_{н}, \quad (4)$$

где $T_{н}$ — начальная температура эксперимента, в приведенном примере $T_{н} = 77^\circ\text{C}$.

Основой предложенной методики построения и оптимизации параметров СП кривой плавления является смещение начала оси температур путем использования расчетного значения температуры $T = T_p$ в формулах (1)–(3). Смещение оси позволяет уменьшить количество параметров СП, а также улучшить сходимость аппроксимирующей функции с экспериментальными данными.

Наиболее часто в качестве критерия оптимальности описания экспериментальных данных используется критерий наименьших квадратов [12], при этом определяется такая функциональная зависимость, при которой сумма квадратов отклонений экспериментальных от соответствующих им функциональных значений должна быть минимальной.

В четвертом столбце табл. 1 приведены значения флуоресценции F_c , вычисленные по формуле (1). В следующем столбце — квадраты отклонений $D_c = (F - F_c)^2$, а в последней, целевой ячейке, — сумма квадратов отклонений S .

Нахождение параметров СП выполнено в программе Excel средством анализа *Поиск решения* из меню *Данные*, при этом оптимизированные параметры f_0 – f_3 соответствуют минимальному значению величины S . Определены следующие значения оптимизированных параметров:

$$f_0 = 527.29; f_1 = -25.324; f_2 = 29.82; f_3 = 2.55.$$

На рис. 1 приведен график экспериментальных значений кривой плавления ДНК, а также график модели на основе СП с оптимизированными параметрами. Эти графики отражают зависимости интенсивности флуоресценции F и F_c от температуры $T_{и}$, приведенные в табл. 1. Можно отметить хорошее совпадение этих графиков.

При аппроксимации степенным полиномом 3-го порядка не требуется предварительный подбор начальных значений параметров, что является явным преимуществом новой методики перед методикой на основе СФ.

АДЕКВАТНОСТЬ МОДЕЛИ СП

Для проверки адекватности модели используется коэффициент детерминации R^2 (*R-квадрат*), который оценивает соответствие модели экспериментальным данным [13]. Чем ближе значение R^2 к 1, тем выше адекватность модели.

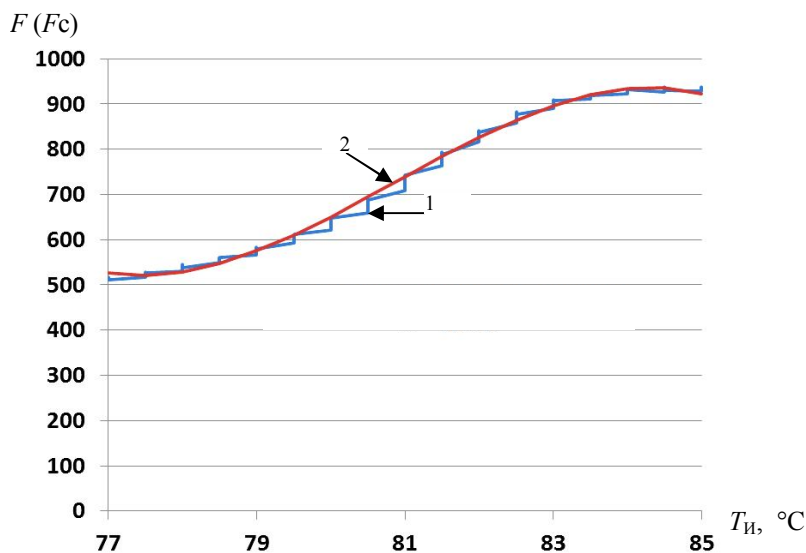


Рис. 1. Графики кривой плавления.

1 — экспериментальная кривая, имеющая вид ступенек; 2 — графическое отображение модели СП с оптимизированными параметрами, гладкая кривая $y = -2.5583 x^3 + 29.824 x^2 - 25.33 x + 527.3$. Вертикальная ось — относительная величина интенсивности флуоресценции F и F_c ; горизонтальная ось — измеренные значения температуры образцов $T_{и}$ ($^{\circ}\text{C}$)

С помощью программы Excel построен график полиномиальной зависимости, определены ее параметры и значение коэффициента детерминации (рис. 1):

$$y = -2.5583 x^3 + 29.824 x^2 - 25.33 x + 527.3; \\ R^2 = 0.9956.$$

На основании полученных результатов можно сделать следующие выводы:

- коэффициенты полиномиальной зависимости полностью совпадают с ранее оптимизированными параметрами;
- доказана адекватность модели на основе СП: величина R^2 весьма близка к 1.

ОСОБЕННОСТИ МОДЕЛИ КРИВОЙ ПЛАВЛЕНИЯ НА ОСНОВЕ СП

Особенности модели плавления на основе СП демонстрируются графиками первой и второй производных этой модели на рис. 2 и 3, которые получены в результате вычислений соответственно по формулам (2) и (3) при определенных значениях оптимизированных параметров.

Ранее нами в статье [14] для аппроксимации производной кривой плавления без смещения шкалы температур применялся полином 7-й степени. Новая методика за счет использования расчетных значений температуры T_p вместо измерен-

ных значений температуры $T_{и}$ позволяет использовать полином 3-й степени, при этом сходимость аппроксимирующей функции с экспериментальными данными увеличивается, а количество параметров уменьшается.

На рис. 3 изображен график второй производной модели СП. Точка пересечения графика с горизонтальной осью соответствует максимуму первой производной и значению точки перегиба модели СП, а также является значением температуры плавления T_m в шкале расчетных значений температур. На основании этого предлагается для вычисления T_m использовать формулу (3) при расчетных значениях температур $T = T_p$ ($^{\circ}\text{C}$), вычисленных по формуле (4). При $F_C'' = 0$ решение уравнения (3) находится по формуле

$$T_{mp} = -f_2 / 3f_3. \quad (5)$$

В приведенном примере найденное значение $T_{mp} = 3.89$ $^{\circ}\text{C}$.

Переход в шкалу измерительных значений температур для вычисления величины T_m ($^{\circ}\text{C}$) можно выполнить по формуле

$$T_m = (T_H + T_{mp}). \quad (6)$$

При $T_H = 77$ $^{\circ}\text{C}$ получается значение $T_m = 80.89$ $^{\circ}\text{C}$.

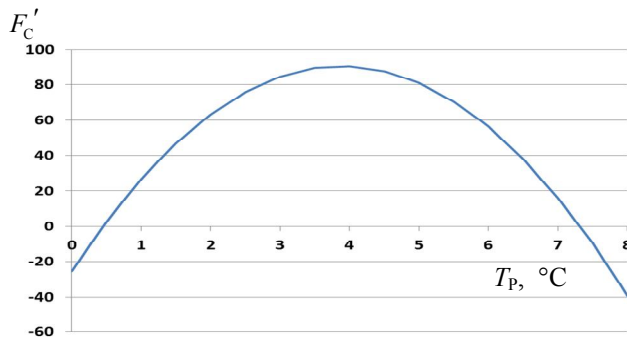


Рис. 2. График первой производной модели СП. Вертикальная ось — относительная величина F'_C ; горизонтальная ось — расчетные значения температуры T_p ($^{\circ}\text{C}$)

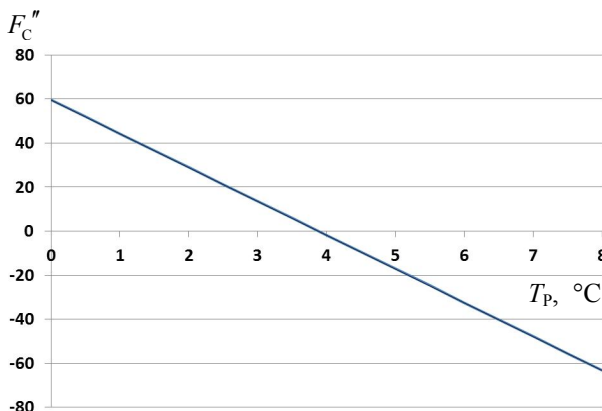


Рис. 3. График второй производной модели СП. Вертикальная ось — относительная величина F''_C ; горизонтальная ось — расчетные значения температуры T_p ($^{\circ}\text{C}$)

Для выполнения расчетов можно объединить формулы (5) и (6):

$$T_m = T_H - f_2 / 3f_3. \quad (7)$$

Такое определение T_m является преимуществом новой методики, т. к. при применении методики на основе СФ для нахождения величины T_m требуются дополнительные операции: интерполяция, дифференцирование и поиск максимума.

СРАВНЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ВЫЧИСЛЕНИЯ ТЕМПЕРАТУРЫ ПЛАВЛЕНИЯ ДНК

Вычисленные с помощью методики на основе СП значения T_m 8 проб в соседних пробирках одного ряда приведены во второй строке табл. 2.

В третьей строке приведены значения T_m этих же проб, вычисленные с помощью методики на основе СФ.

На рис. 4 демонстрируются графики, соответствующие значениям T_m в табл. 2.

Значения T_m соответствуют обычной шкале температур в °С. Отличие значений T_m двух графиков находится в пределах 0.04–0.09 °С. Макси-

мальная разность значений T_m крайних проб составляет 0.25 и 0.30 °С. Различие значений T_m проб соседних в одном ряду пробирок обусловлено неравномерностью распределения температуры держателя пробирок.

В результате сравнения 2 методик не было выявлено недостатков методики на основе СП перед методикой на основе СФ.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ ПЛАВЛЕНИЯ ДНК НА ОСНОВЕ МОДЕЛИ СП

Для определения температуры плавления ДНК можно рекомендовать следующую последовательность вычислений:

- 1) определение расчетных значений температуры T_p по формуле (4);
- 2) определение значений оптимизированных параметров f_0-f_3 по формуле (1) при расчетных значениях температуры T_p ;
- 3) вычисление температуры плавления ДНК T_m по формуле (7).

Табл. 2. Сравнение результатов вычисления T_m

Методика вычисления T_m	№ пробы							
	1	2	3	4	5	6	7	8
$T_m, ^\circ\text{C}$ СП	80.89	80.90	81.03	81.09	81.05	80.99	81.05	81.14
$T_m, ^\circ\text{C}$ СФ	80.93	80.94	81.10	81.17	81.12	81.06	81.12	81.23

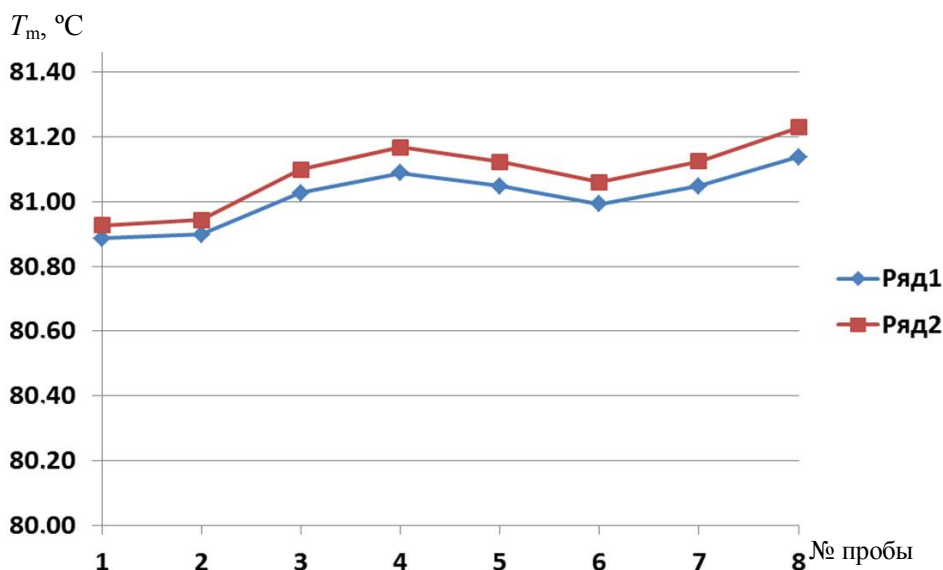


Рис. 4. Сравнение результатов измерения величин T_m . Ряд 1 — СП T_m ; ряд 2 — СФ T_m . Вертикальная ось — величина $T_m, ^\circ\text{C}$; горизонтальная ось — номер пробы

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Основная новизна предложенной методики состоит в использовании смещенной и укороченной шкалы температур, содержащей расчетные значения температуры T_p , вычисленные по формуле (4). Такая шкала температур использована в качестве горизонтальной оси на рис. 2 и 3. После определения значений оптимизированных параметров f_0 – f_3 по формуле (1) выполнен обратный переход по формуле (6) в обычную шкалу измерительных значений температур $T_{и} = 77$ – 85 °С, которая приведена на рис. 1.

Предложенная методика, как и методика на основе СФ, имеет ряд преимуществ по сравнению с известными. Она позволяет использовать непосредственно исходные данные, полученные в результате эксперимента плавления при ступенчатом изменении температуры. При этом отсутствуют операции суммирования отсчетов флуоресцентного отклика при выдержке температуры на каждой ступени, операции дифференцирования и фильтрации.

При использовании предлагаемой методики можно использовать шаг изменения температуры 0.5 °С, при этом значительно экономится время анализа, а температура плавления может быть вычислена с дискретностью 0.01 °С, что соответствует условиям метода плавления высокого разрешения.

Методика на основе СП позволяет значительно сократить диапазон изменения температуры: в приведенном примере использован диапазон 77–85 °С, время анализа составило 18 мин. Методика на основе СФ также позволяет использовать сокращенный диапазон, но при использовании методики на основе СП не требуется предварительное определение начальных значений параметров аппроксимирующей функции, что увеличивает сходимость функции с экспериментальными данными.

После автоматического определения значений оптимизированных параметров f_0 – f_3 , параметры f_2 и f_3 используются для вычисления температуры плавления ДНК T_m по формуле (7). Это также является преимуществом, т. к. при использовании методики на основе СФ требуются дополнительные операции для нахождения величины T_m : интерполяции, дифференцирования и поиска максимума.

Показано, что зависимость температуры плавления ДНК T_m от номера пробы определена в основном неравномерностью распределения температуры лунок держателя пробирок: макси-

мальная разность температур равна 0.25 °С. На основании полученных результатов можно предложить использовать методику на основе СП для калибровки неравномерности распределения температуры держателя пробирок в абсолютной шкале температур.

Работа выполнена в ИАП РАН в рамках НИР «Научно-методическое обеспечение разработок аналитических систем для нанобиотехнологии и диагностики социально значимых заболеваний и особо опасных инфекций на основе генетических, иммунных и физико-химических методов».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Веденов А.А., Дыхне А.М., Франк-Каменецкий М.Д. Переход спираль—клубок в ДНК // Успехи физических наук. 1971. Т. 105, № 11. С. 479–519. Doi: 10.3367/UFNr.0105.197111d.0479.
2. Лаврова О.И., Альварес Фигероа М.В., Творогова М.Г. HRM — новый молекулярный метод определения лекарственной устойчивости микобактерий туберкулеза // Клиническая лабораторная диагностика. 2014. № 7. С. 62–64.
3. Календарь Р.Н., Сиволан Ю.М. Полимеразная цепная реакция с произвольными праймерами // Биополимеры и клетка. 1996. Т. 11, № 3–4. С. 55–65. URL: http://www.biopolymers.org.ua/pdf/ru/11/3/055/biopolym_cell-1995-11-3-055-ru.pdf.
4. Сиволан Ю.М., Календарь Р.Н., Чеботарь С.В. Генетический полиморфизм злаковых растений при помощи ПЦР с произвольными праймерами // Цитология и генетика. 1994. Т. 28, № 6. С. 54–61. URL: <http://www.biocenter.helsinki.fi/bi/genomedynamics/Pdfs/zyt.pdf>.
5. Вычисление температуры плавления. URL: https://ru.wikipedia.org/wiki/Гибридизация_ДНК.
6. Ребриков Д.В., Саматов Г.А., Трофимов Д.Ю. и др. ПЦР в "реальном времени". М.: БИОМ. Лаборатория знаний, 2009. 223 с. URL: <http://nashol.com/2014072579193/pcr-v-realnom-vremeni-rebrikov-d-vsamatov-g-a-trofimov-d-u-2009.html>.
7. Melting Temperature Calculation T_m ToolSM. University of Utah, Wittwer Lab (USA). URL: <http://www.dna.utah.edu/tm/tool.html>.
8. Introduction to High Resolution Melt Analysis. Application Guide. URL: <http://www.kapabiosystems.com>.
9. Белов Д.А., Корнева Н.А., Альдекеева А.С., Белов Ю.В., Киселев И.Г. Повышение разрешающей способности генетических анализаторов при определении температуры плавления ДНК // Научное приборостроение. 2016. Т. 26, № 2. С. 17–22. URL: <http://213.170.69.26/mag/2016/abst2.php#abst2>.

10. Белов Д.А., Альдекеева А.С., Белов Ю.В., Киселев И.Г. Методики определения рабочих температур термостатирования анализаторов нуклеиновых кислот // Научное приборостроение. 2017. Т. 27, № 4. С. 34–39. URL: <http://213.170.69.26/mag/2017/abst4.php#abst5>.
11. Эйдельштейн М.В., Алексеев Я.И., Никулин А.А., Романов А.В., Козлов Р.С. Способ детекции специфических нуклеотидных последовательностей и нуклеотидных замен с помощью ПЦР в режиме реального времени с эффектом гашения флуоресценции зонда праймером. Патент на изобретение РФ № 2451086, МПК С12Q 1/68, опублик. 20.05.2012. Бюл. № 14.
12. Земляков В.В. Обработка результатов измерений в Matlab: учебно-методическое пособие. Ростов-на-Дону, 2008. 40 с.
13. Сирота А.А. Методы и алгоритмы анализа данных и их моделирование в MATLAB: учеб. пособие. СПб.: БХВ-Петербург, 2016. 384 с.
14. Белов Д.А., Белов Ю.В., Манойлов В.В. Разработка методик обработки сигналов плавления ДНК // Научное приборостроение. 2017. Т. 27, № 1. С. 83–89. URL: <http://213.170.69.26/mag/2017/abst1.php#abst14>.

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

Контакты: Белов Дмитрий Анатольевич,
onoff_10@mail.ru

Материал поступил в редакцию 31.01.2018

NEW METHOD OF DNA MELTING SIGNAL TREATMENT

D. A. Belov, Yu. V. Belov, V. E. Kurochkin

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

The improved model of DNA melting signal is proposed in the article. The model is based on power polynomials of degree 3 (SP). Based on the model, a technique for processing the DNA melting signal has been developed, the main result of which is the determination of the DNA melting temperature T_m . The new technique allows to decrease the analysis time by increasing the temperature measurement pitch while simultaneously narrowing temperature range. Adequacy proofs of the model based on the SP are given. The application results of developed technique and of the known technique based on the sigmoid function (SF) are compared. The possibility of the technique using for determining the thermocycler tubes holder temperature distribution nonuniformity during melting mode is shown.

Keywords: DNA, PCR, nucleic acid analyzer, approximation, High Resolution Melt analysis

REFERENCES

- Vedenov A.A., Dychne A.M., Frank-Kamenezkiy M.D. [Transition a spiral—a ball in DNA]. *Uspechi fizicheskikh nauk* [Achievements of physical sciences], 1971, vol. 105, no. 11, pp. 479–519. Doi: 10.3367/UFNr.0105.197111d.0479. (In Russ.).
- Lavrova O.I., Al'vares Figeroa M.V., Tvorogova M.G. [The HRM — new molecular technique of detection of pharmaceutical resistance of micobacteria of tuberculosis]. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika* [Russian Clinical Laboratory Diagnostics], 2014, no. 7, pp. 62–64. (In Russ.).
- Kalendar R.N., Sivolap Yu.M. [Polymerase chain reaction with arbitrary oligonucleotide primers]. *Biopolimery i kletka* [Biopolymers and cell], 1996, vol. 11, no. 3-4, pp. 55–65. Doi: 10.7124/bc.0003ED.
- Sivolap Yu.M., Kalendar' R.N., Chebotar' S.V. [Genetic polymorphism of cereals by means of PCR with arbitrary primers]. *Zitologiya i genetika* [Cytology and genetics], 1994, vol. 28, no. 6, pp. 54–61. URL: <http://www.biocenter.helsinki.fi/bi/genomedynamics/Pdfs/zyt.pdf>. (In Russ.).
- Vychislenie temperatury plavleniya* [Computation of a melting temperature]. (In Russ.). URL: https://ru.wikipedia.org/wiki/Гибридизация_ДНК.
- Rebrikov D.V., Samatov G.A., Trofimov D.Yu. et al. *PCR v "real'nom vremeni"* [PCR in "real time"]. Moscow, BI-OM. Laboratoriya znaniy Publ., 2009. 223 p. (In Russ.). URL: <http://nashol.com/2014072579193/pcr-v-realnom-vremeni-rebrikov-d-vsamatov-g-a-trofimov-d-u-2009.html>.
- Melting Temperature Calculation T_m ToolSM*. University of Utah, Wittwer Lab (USA). URL: <http://www.dna.utah.edu/tm/tool.html>.

8. *Introduction to High Resolution Melt Analysis. Application Guide*. URL: <http://www.kapabiosystems.com>.
9. Belov D.A., Korneva N.A., Aldekeeva A.C., Belov Yu.V., Kiselev I.G. [Genetic analyzer resolution increasing at DNA melting temperature determination]. *Nauchnoe Priboroostroenie* [Scientific Instrumentation], 2016, vol. 26, no. 2, pp. 17–22. (In Russ.). Doi: 10.18358/np-26-2-i1722.
10. Belov D.A., Aldekeeva A.C., Belov Yu.V., Kiselev I.G. [Nucleic acids analyzer holes temperature spread determining method]. *Nauchnoe Priboroostroenie* [Scientific Instrumentation], 2017, vol. 27, no. 4, pp. 34–39. Doi: 10.18358/np-27-4-i3439. (In Russ.).
11. Eydel'shteyn M.V., Alekseev Ya.I., Nikulin A.A., Romanov A.V., Kozlov R.S. *Sposob detekzii spetsificheskikh nukleotidnykh posledovatel'nostey i nukleotidnykh zamen s pomoshch'yu PCR v rezhime real'nogo vremeni s efektom gasheniya fluoreszenzii zonda praymerom* [Way of detection of the specific nucleotide sequences and nucleotide replacements by means of PCR in real time with effect of clearing of fluorescence of the probe with a primer]. Patent RF no. 2451086, МПК C12Q 1/68, is published 20.05.2012. Bulletin No. 14. (In Russ.).
12. Zemlyakov V.V. *Obrabotka rezul'tatov izmereniy v Matlab: uchebno-metodicheskoe posobie* [[Processing of results of measurements in Matlab: educational and methodical manual]]. Rostov-na-Donu, 2008. 40 p. (In Russ.).
13. Sirota A.A. *Metody i algoritmy analiza dannykh i ich modelirovanie v MATLAB: ucheb. posobie* [Methods and analysis algorithms of data and their simulation in MATLAB: studies manual]. Saint-Petersburg, BHV-Petersburg Publ., 2016. 384 p. (In Russ.).
14. Belov D.A., Belov Yu.V., Manoylov V.V. [DNA melting data processing techniques development]. *Nauchnoe Priboroostroenie* [Scientific Instrumentation], 2017, vol. 27, no. 1, pp. 83–89. (In Russ.). Doi: 10.18358/np-27-1-i8389.

Contacts: *Belov Dmitriy Anatolyevich*,
onoff_10@mail.ru

Article received in edition 31.01.2018