

УДК 543.426; 543.9

© Д. А. Белов, Ю. В. Белов, А. Л. Широкопад

РАЗРАБОТКА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ВЕРСИИ ПРОГРАММНОГО ОБЕСПЕЧЕНИЯ НА ОСНОВЕ НОВОЙ МЕТОДИКИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТЕМПЕРАТУРЫ ПЛАВЛЕНИЯ ДНК

Предложена новая методика автоматического определения температуры T_m плавления ДНК, основанная на аппроксимации зависимости флуоресцентного отклика плавления ДНК. Диапазон аппроксимации определяется автоматически и используется для вычисления величины T_m . Полностью исключена составляющая погрешности, которая определяется дискретностью сигналов. Показана возможность сокращения времени анализа. На основе предложенной методики разработана экспериментальная версия программного обеспечения режима плавления ДНК высокого разрешения для анализаторов нуклеиновых кислот АНК-32, АНК-48 и экспериментального образца АНК-96. Экспериментально определены случайная и систематическая погрешности измерения величины T_m .

Кл. сл.: ДНК, генетический анализатор, флуоресцентная детекция

ВВЕДЕНИЕ

Метод плавления ДНК основан на эффекте перехода двойной спирали молекулы ДНК в клубкообразное состояние при повышении температуры [1]. При этом наблюдается резкое изменение интенсивности флуоресцентного отклика (ФО) красителей, присоединенных к молекуле ДНК [2].

Значение температуры плавления ДНК (T_m) зависит от длины фрагмента ДНК и процентного содержания суммы нуклеотидов С и G [3–6], поэтому метод плавления ДНК используется в частности для анализа однонуклеотидных замен.

Можно привести следующие способы определения значения T_m .

1) В качестве величины T_m обычно принимается положение на температурной оси максимума первой производной зависимости флуоресцентного отклика плавления ДНК по температуре (1ПФО).

2) В качестве величины T_m можно принять положение на температурной оси точки перегиба графика зависимости ФО от температуры пробы.

В соответствии с первым способом определения значения T_m ранее в наших статьях [7, 8] были предложены методики определения значения T_m на основе аппроксимации 1ПФО с помощью модели на основе функции Гаусса и модели на основе полинома седьмой степени.

В соответствии со вторым способом определения значения T_m в статье [9] предложена методика

аппроксимации зависимости ФО с помощью модели на основе сигмоидальной функции.

Все предложенные методики обладают общими преимуществами: в процессе аппроксимации значительно уменьшаются погрешности определения значения T_m , обусловленные шумами и дискретностью сигналов.

Однако предложенные методики требуют ручного определения начальных и конечных значений диапазона аппроксимации, поэтому возникает необходимость разработки методики, обеспечивающей автоматическое определение границ аппроксимации зависимости ФО.

В известном программном обеспечении режима плавления ANK_Shell, разработанном в ИАП РАН для анализаторов нуклеиновых кислот, пользователем последовательно активизируются операции: фильтрация, привязка к нулю, привязка к максимуму, дифференцирование и определение T_m . Поскольку аппроксимация ФО не используется, значения T_m вычисляются с дискретностью, равной шагу изменения температуры. Для обеспечения высокого разрешения шаг изменения температуры не должен превышать 0.1 °С, при этом с уменьшением шага значительно увеличивается время измерений [10]. Для исключения операций привязки к нулю, привязки к максимуму и ручного определения границ аппроксимации разработано программное обеспечение режима плавления ДНК, позволяющее аппроксимировать ФО, автоматически определять T_m и исключить погрешность дискретизации.

ОСОБЕННОСТИ ПОЛУЧЕНИЯ ИСХОДНЫХ ДАННЫХ ЗАВИСИМОСТИ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО ОТКЛИКА ПЛАВЛЕНИЯ ДНК

В флуориметрическом детекторе анализатора нуклеиновых кислот применен алгоритм, при котором выполняется оценка по методу максимальной апостериорной плотности вероятностей. Для уменьшения шумов отсчеты флуоресцентного отклика суммируются (интегрируются) на интервале наблюдения [11, 12]: в детекторе используется выборка отсчетов 12-разрядного АЦП с периодом 100 мкс, общее время измерений составляет 80 мс, что позволяет накопить нужную статистику для оценки плотности вероятности и построить ФНЧ с полосой 12.5 Гц. Такой алгоритм позволил обеспечить период опроса всех образцов за 3 с.

В качестве примеров использованы исходные (сырые) данные, полученные при плавлении ДНК на анализаторе АНК-48, который серийно выпускается в ИАП РАН, и на экспериментальном образце АНК-96. Для получения исходных данных были применены пробы, содержащие зонд—ДНК—мишень с флуорофором (РОХ) в комбинации с гасителем, производства ЗАО "СИНТОЛ". Параметры эксперимента: температура изменялась в диапазоне 76–86 °С при шаге 0.5 °С. Каждое значение флуоресцентного отклика определяется как сумма 5 измерений при каждом шаге изменения температуры пробы в интервале 20 с (АНК-48) или сумма 8 измерений в интервале 30 с (АНК-96). Общее время эксперимента — не более 10 мин.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ДИАПАЗОНА АППРОКСИМАЦИИ ЗАВИСИМОСТИ ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО ОТКЛИКА ПЛАВЛЕНИЯ ДНК

При ручном задании диапазона аппроксимации зависимости ФО результат измерения величины T_m зависит от взаимного расположения на графике зависимости ФО начала и конца диапазона. В настоящей работе предложен и реализован автоматический способ для выбора диапазона аппроксимации зависимости ФО плавления ДНК, при этом использованы сигналы первой и второй производных зависимости ФО по температуре.

Можно отметить некоторые особенности дифференцирования зависимости ФО. Первое дифференцирование предложено выполнять по формуле

$$F_{i+1}' = F_{i+1} - F_i, \quad (1)$$

где F_{i+1}' — результат первого дифференцирования при температуре t_{i+1} ; F_{i+1} и F_i — исходные данные ФО при температуре t_{i+1} и t_i соответственно.

Второе дифференцирование предложено выполнять по формуле

$$F_i'' = F_i' - F_{i+1}', \quad (2)$$

где F_i'' — результат второго дифференцирования при температуре t_i ; F_i' и F_{i+1}' — результаты первого дифференцирования при температуре t_i и t_{i+1} соответственно.

Преимущество такого способа дифференцирования заключается в том, что при втором дифференцировании результат F_i'' не сдвинут по шкале температур по отношению к исходным данным F_i , поскольку при втором дифференцировании компенсируется сдвиг по температуре результатов первого дифференцирования.

В качестве левой границы диапазона аппроксимации зависимости ФО для каждой пробы принимается максимальное значение второй производной зависимости ФО, а в качестве правой границы диапазона — минимальное значение второй производной. Такой диапазон соответствует условию максимального отношения сигнала к шуму для значений первой производной ФО, поскольку границы диапазона аппроксимации зависимости ФО соответствуют точкам перегиба графика первой производной зависимости ФО.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ ПЛАВЛЕНИЯ ДНК T_m

Для определения величины T_m предлагается аппроксимировать зависимость ФО с помощью модели на основе полинома 3-й степени, приведенной ранее в нашей работе [13], по формуле:

$$F_{Ci} = f_0 + f_1 \cdot t_i + f_2 \cdot t_i^2 + f_3 \cdot t_i^3, \quad (3)$$

где F_{Ci} — относительная величина интенсивности ФО при каждом шаге температуры образца t_i (°С); $f_0 \div f_3$ — коэффициенты при степенных слагаемых полинома, значения которых вычисляются по методу наименьших квадратов (МНК) [14, с. 105–108], [15].

При реализации МНК определяется сумма квадратов отклонений Q модели F_{Ci} от экспериментальных данных F_i :

$$Q = \sum_{i=0}^{n-1} (F_{Ci}(t_i, f_0, f_1, f_2, f_3) - F_i)^2, \quad (4)$$

где n — количество отсчетов.

Минимум суммы квадратов отклонений Q определяется из условий равенства нулю частных производных функции Q путем изменения коэффициентов $f_0 \div f_3$.

Можно отметить особенности этой модели: значение температуры для точки $F_C'' = 0$ соответствует максимуму первой производной

и значению точки перегиба зависимости Φ_0 от температуры. Поэтому в качестве величины T_m принимается значение температуры при $F_C'' = 0$ по формуле

$$T_m = -f_2 / 3f_3. \quad (5)$$

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ВЕРСИЯ ПРОГРАММНОГО ОБЕСПЕЧЕНИЯ НА ОСНОВЕ НОВОЙ МЕТОДИКИ

На основе предложенной методики разработана экспериментальная версия программного обеспечения для анализаторов нуклеиновых кислот АНК-32, АНК-48 и экспериментального образца АНК-96 с условным названием ANK_Melting.

На рис. 1 изображена левая часть окна, в котором осуществляется выбор анализируемых пробирок для вывода графиков исходных зависимостей Φ_0 , графиков аппроксимации, графиков первой и второй производных, выбор диапазона по времени, например до 6000 с, и начального диапазона по температуре (76 °C и 86 °C).

Для определения диапазона аппроксимации сырые данные дважды дифференцируются, однако в результате дифференцирования значительно уменьшаются сигналы, как это видно на рис. 2, при этом ухудшается отношение сигнала к шуму. Для повышения отношения сигнала к шуму программное обеспечение ANK_Melting позволяет

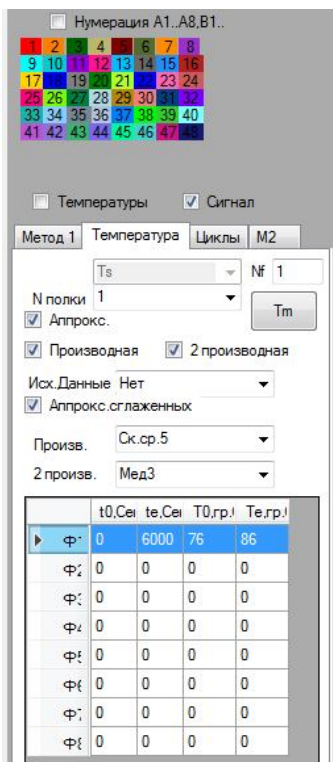


Рис 1. Окно выбора параметров для просмотра и обработки зависимости флуоресцентного отклика плавления ДНК

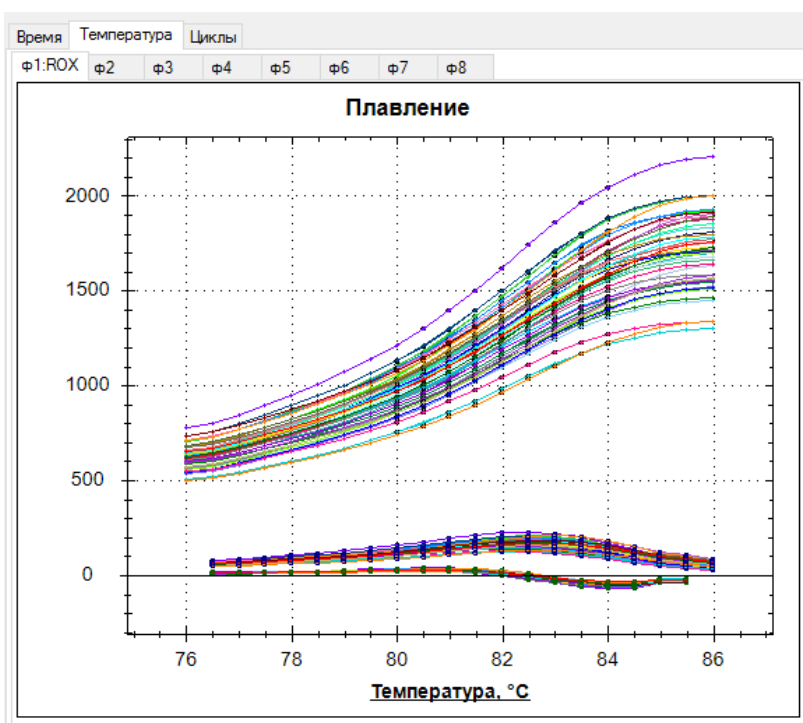


Рис. 2. Активное окно с графиками зависимостей Φ_0 (верхний пучок кривых) и их первой и второй производных (нижний пучок кривых). Вертикальная ось — относительные единицы флуоресценции

применять различные способы фильтрации первой и второй производных зависимости ФО, в частности фильтр скользящего среднего и медианный фильтр.

Фильтр скользящего среднего является одним из наиболее простых фильтров, но при этом отлично сокращает шумы. Медианный фильтр удаляет из сигнала фрагменты с размерами, меньшими, чем половина размера окна фильтра. Наиболее известным применением медианной фильтрации является устранение из сигнала коротких импульсных помех [16]. Фильтры использованы только для определения диапазона аппроксимации, поэтому не влияют на значение определяемой величины T_m .

На рис. 2 изображена правая часть активного окна на экране компьютера, в котором выводятся графики зависимостей ФО 48 проб (АНК-48) с наложением графиков аппроксимации (верхние), графики первых (средние) и вторых (нижние) производных зависимостей ФО.

На рис. 3 в окне, удобном для наблюдения,

приведены графики первых и вторых производных зависимостей ФО плавления ДНК в 8 пробирках одного ряда.

В табл. 1 приведены результаты определения величины T_m от 48 проб. Для сравнения в последней строке табл. 1 приведены результаты применения известной программы ANK_Shell.

Высокое качество аппроксимации зависимостей ФО можно оценить с помощью коэффициента детерминации R^2 . Определенные в программе Excel для всех проб значения R^2 — не менее 0.99.

Сравнение результатов определения величины T_m позволяет сделать следующие выводы:

- при применении известной программы ANK_Shell обеспечивается дискретность результатов, равная шагу изменения температуры ($0.5\text{ }^\circ\text{C}$); определена величина, которая является характеристикой погрешности, СКО = $0.29\text{ }^\circ\text{C}$;

- при применении известной вновь разработанной программы ANK_Melting обеспечивается дискретность результатов не более $0.01\text{ }^\circ\text{C}$. Величина СКО = $0.20\text{ }^\circ\text{C}$.

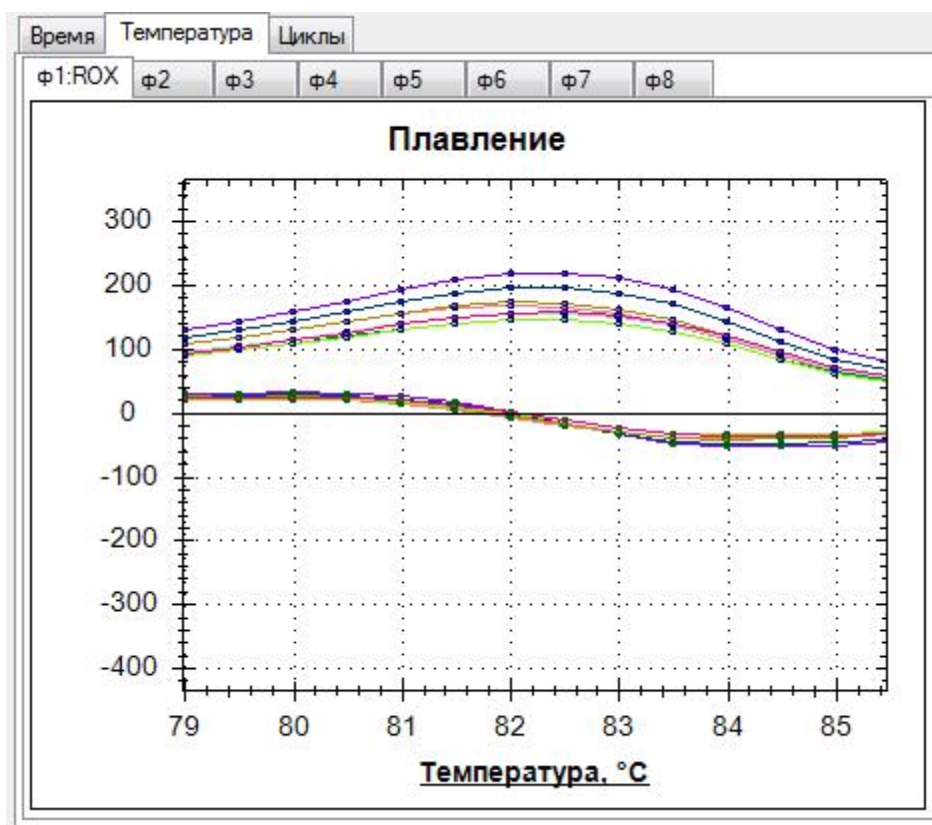


Рис. 3. Окно с графиками первой и второй производных зависимостей ФО. Вертикальная ось — относительные единицы флуоресценции

Табл. 1. Величины T_m и СКО (°С)

№ пробы	1	2	3	...	46	47	48	СКО
ANK_Melting	82.40	82.46	82.43	...	82.26	82.33	82.33	0.20
ANK_Shell	82.50	82.50	82.50	...	82.00	82.00	82.50	0.29

АНАЛИЗ ПОГРЕШНОСТЕЙ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТЕМПЕРАТУРЫ ПЛАВЛЕНИЯ ДНК T_m

Приведенные в табл. 1 значения СКО являются характеристиками погрешностей, которые содержат систематическую и случайную составляющие.

Ранее в нашей статье [13] было показано, что отклонения значений T_m множества пробирок с одинаковыми образцами от среднего значения могут быть использованы для определения неравномерности распределения температуры в лунках

держателя пробирок. Эти отклонения значений T_m можно считать систематическими погрешностями, поскольку они определяются тепловыми параметрами конкретного анализатора.

Случайные погрешности можно определить путем определения отклонений значений T_m от среднего значения в каждой пробирке при многократных анализах. Такие измерения были выполнены на экспериментальном образце анализатора АНК-96 с образцами и условиями, приведенными ранее.

Табл. 2. Величины T_m , СЗ и СКО (°С)

№ пробы	Положение пробы	Номер анализа					Функции	
		A1	A2	...	A11	A12	СЗВ	СКОВ
1	B1	80.93	80.86	...	80.82	80.85	80.87	0.03
2	B2	80.84	80.83	...	80.74	80.76	80.77	0.03
⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮
31	E7	81.09	81.03	...	81.00	80.93	81.01	0.04
32	E8	81.25	81.20	...	81.20	81.15	81.16	0.05
Функции	СЗА	81.04	81.04	...	80.99	80.98	81.01	0.03
	СКОА	0.13	0.13	...	0.13	0.13	0.13	—

Табл. 3. Величины T_m , СЗ и СКО (°С)

№ пробы	Положение пробы	Номер анализа					Функции	
		A1	A2	...	A11	A12	СЗВ	СКОВ
1	I1	80.80	80.88	...	80.81	80.81	80.80	0.03
2	I2	81.11	81.14	...	81.20	81.19	81.17	0.03
⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮
31	L7	81.51	81.49	...	81.47	81.39	81.47	0.04
32	L8	81.80	81.71	...	81.69	81.68	81.71	0.05
Функции	СЗА	81.18	81.20	...	81.15	81.15	81.16	0.04
	СКОА	0.35	0.32	...	0.30	0.29	0.31	—

В ячейках табл. 2, расположенных в столбце А1 и строках от В1 до Е8, приведены результаты определения величины T_m от 32 проб, которые расположены в лунках держателя пробирок от В1 до Е8. В столбцах от А2 до А12 находятся результаты еще 11 повторных анализов. В столбце СЗВ приведены средние значения величин T_m , а в столбце СКОВ — значения СКО от 12 анализов каждой пробы. В строке СЗА — средние значения величин T_m при каждом анализе, а в строке СКОА — значения СКО от 32 проб при каждом анализе.

Первый основной результат (1ОР — среднее значение от значений СКО каждой из 32 проб при 12 анализах) приведен в ячейке СЗА, СКОВ: 1ОР = 0.03 °С. Этот результат определяет случайную погрешность определения величин T_m при 12 анализах 32 проб.

Второй основной результат (2ОР — среднее значение от значений СКО всех 32 проб при 12 анализах) приведен в ячейке СЗВ, СКОА: 2ОР = 0.13 °С. Этот результат оценивает в основном систематическую погрешность определения величин T_m 32 проб при 12 анализах.

Подобные результаты приведены в табл. 3. Величины T_m получены при обработке зависимостей ФО других 32 проб, которые расположены в лунках держателя проб от И1 до Л8.

Основные результаты: 1ОР = 0.04 °С и 2ОР = 0.31 °С.

Сравнение результатов определения величин 1ОР и 2ОР позволяет сделать следующие выводы:

– величины 1ОР (0.03 и 0.04 °С) определяют случайные погрешности измерения величин T_m при 12 анализах двух кластеров из 32 проб;

– величины 2ОР (0.13 и 0.31 °С) определяют в основном систематические погрешности измерения величин T_m двух кластеров из 32 проб при 12 анализах, поскольку они отражают неравномерность распределения температуры в лунках держателя пробирок.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Предложена новая методика автоматического определения величины температуры плавления T_m , основанная на аппроксимации зависимости флуоресцентного отклика плавления ДНК. Диапазон аппроксимации определяется автоматически и используется для определения величины T_m .

За счет аппроксимации зависимости флуоресцентного отклика плавления ДНК полностью исключена составляющая погрешности, которая определяется дискретностью сигналов.

Высокая производительность методики подтверждена параметрами выполненных экспериментов: при диапазоне изменения температуры от 76 до 86 °С, при шаге 0.5 °С и длительности на-

блюдения ФО при каждом шаге, равной 30 с, общее время экспериментов составляет 10 мин.

Показано, что за счет высокой производительности методики можно выполнить повторные анализы, по результатам которых можно экспериментально определить случайную и систематическую погрешности измерения величины T_m .

На основе предложенной методики разработана экспериментальная версия программного обеспечения режима плавления ДНК высокого разрешения для анализаторов нуклеиновых кислот АНК-32, АНК-48 и экспериментального образца АНК-96.

Преимущество разработанной экспериментальной версии программного обеспечения на основе новой методики — полная автоматизация вычислений. После выбора файла данных достаточно нажать кнопку T_m в окне выбора параметров, чтобы получить таблицу значений T_m для всех анализируемых проб.

Авторы выражают заинтересованность в проверке методики и программного обеспечения на многочисленных реальных данных и приглашают пользователей анализаторов нуклеиновых кислот АНК-32, АНК-48 к сотрудничеству. Для этого файл с исходными данными, полученными при плавлении ДНК с шагом 0.5 °С, имеющий расширение .dank, необходимо прислать по электронному адресу, приведенному в конце статьи. Авторы в ответном письме приложат результаты обработки в графическом и табличном видах.

Работа выполнена в ИАП РАН в рамках НИР по государственному заказу ФАНО 0074-2014-0010, государственный регистрационный номер: АААА-А16-116041310008-3.

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. HRM — новый молекулярный метод определения лекарственной устойчивости микобактерий туберкулеза / О.И. Лаврова, М.В. Альварес Фигероа, М.Г. Творогова // Клиническая лабораторная диагностика. 2014. № 7. С. 62–64.
3. Календарь Р.Н., Сиволап 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. Сиволап 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. Гибридизация ДНК. Вычисление температуры плавления

- ления. URL:
https://ru.wikipedia.org/wiki/Гибридизация_ДНК.
6. Ребриков Д.В., Саматов Г.А., Трофимов Д.Ю., Семёнов П.А., Савилова А.М., Кофиади И.А., Абрамов Д.Д. ПЦР "в реальном времени". М.: БИНОМ, Лаборатория знаний, 2009. 224 с. URL:
<http://nashol.com/2014072579193/pcr-v-realnom-vremeni-rebrikov-d-vsamatov-g-a-trofimov-d-u-2009.html>.
 7. Белов Д.А., Белов Ю.В., Манойлов В.В. Методика обработки данных при плавлении продуктов полимеразной цепной реакции в реальном времени // Научное приборостроение. 2016. Т. 26, № 3. С. 10–14. URL:
<http://213.170.69.26/mag/2016/full3/Art2.pdf>.
 8. 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>.
 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. Никитина Д.И., Маретина М.А., Егорова А.А., Масленников А.Б., Киселев А.В. Использование высокоразрешающего анализа кривых плавления ДНК в диагностике наследственных заболеваний // Медицинская генетика. 2017. Т. 16, № 5. С. 26–33.
 11. Хименко В.И. Случайные данные: структура и анализ. М.: Техносфера, 2017. 423 с.
 12. Петров А.И. Исследование и практическая реализация программно-аппаратных средств проведения полимеразной цепной реакции с наблюдением в реальном времени. Дис. к-та техн. наук, Санкт-Петербург, 2016.
 13. Белов Д.А., Белов Ю.В., Курочкин В.Е. Новая методика обработки флуоресцентного отклика плавления ДНК // Научное приборостроение. 2018. Т. 28, № 1. С. 3–10. URL:
<http://213.170.69.26/mag/2018/abst1.php#abst1>.
 14. Мудров А.Е. Численные методы для ПЭВМ на языках Бейсик, Фортран и Паскаль. Томск: МП "РАСКО", 1991. 272 с.
 15. Лизунова Н.А., Шкроба С.П. Матрицы и системы линейных уравнений. М.: Физматлит, 2007. 171 с.
 16. Бардин Б.В. Быстрый алгоритм медианной фильтрации // Научное приборостроение. 2011. Т. 21, № 3. С. 135–139. URL:
<http://213.170.69.26/mag/2011/abst3.php#abst16>.

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

Контакты: Белов Дмитрий Анатольевич,
 onoff_10@mail.ru

Материал поступил в редакцию 16.04.2018

DEVELOPMENT OF THE EXPERIMENTAL VERSION SOFTWARE, BASED ON THE NEW DNA MELTING TEMPERATURE DETERMINATION TECHNIQUE

D. A. Belov, Yu. V. Belov, A. L. Shirokorad

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

The new technique of automatic DNA melting temperature (T_m) identification, based on approximation of DNA melting signals fluorescent was suggested. The limits of approximation area is specified automatically and is used to calculate the value of T_m . The component of error that is determined by signals discreteness is completely excluded. The possibility of reducing the analysis time is presented. The experimental version of high resolution DNA melting software for nucleic acid analyzers ANK-32, ANK-48 and experimental prototype of ANK-96 was developed on the basis of the offered technique. Random and systematic errors of T_m value measurement were determined experimentally.

Keywords: DNA, genetic analyzer, fluorescent detection

REFERENCES

1. Vedenov A.A., Dychne A.M., Frank-Kamenezkiy M.D. [Transition a spiral — a ball in DNA]. *Uspechi fizicheskich nauk* [Achievements of physical sciences], 1971, vol. 105, no. 11, pp. 479–519. (In Russ.). Doi: 10.3367/UFNr.0105.197111d.0479.
2. Lavrova O.I. Figeroa M.V.A., Tvorogova M.G. [HRM — новый молекулярный метод определения лекарственной устойчивости микобактерий туберкулеза]. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika* [Clinical laboratory diagnostics], 2014, no. 7, pp. 62–64. (In Russ.).
3. Kalendar' R.N., Sivolap Yu.M. [Polymerase chain reaction with arbitrary primers]. *Biopolimery i kletka* [Biopolymers and cell], 1996, vol. 11, no. 3-4, pp. 55–65. (In Russ.). URL: <http://www.biopolymers.org.ua/pdf/ru/11/3/055/biopolym.cell-1995-11-3-055-ru.pdf>.
4. 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. (In Russ.). URL: <http://www.biocenter.helsinki.fi/bi/genomedynamics/Pdfs/zyt.pdf>.
5. *Gibridizatsiya DNK. Vychislenie temperatury plavlenniya* [DNA hybridization. Computation of a melting temperature]. (In Russ.). URL: https://ru.wikipedia.org/wiki/Гибридизация_ДНК.
6. Rebrikov D.V., Samatov G.A., Trofimov D.Yu. Semenov P.A., Savilova A.M., Kofiadi I.A., Abramov D.D. *PCR "v real'nom vremeni"* [PCR "in real time"]. Moscow, BINOM, Laboratoriya znaniy Publ., 2009. 224 p. (In Russ.). URL: <http://nashol.com/2014072579193/pcr-v-realnom-vremenirebrikov-d-vsamatov-g-a-trofimov-d-u-2009.html>.
7. Belov D.A., Belov Yu.V., Manoylov V.V. [Method of processing data in melting of real-time polymerase chain reactions]. *Nauchnoe Priborostroenie* [Scientific Instrumentation], 2016, vol. 26, no. 3, pp. 10–14. Doi: 10.18358/np-26-3-i1014. (In Russ.).
8. Belov D.A., Belov Yu.V., Manoylov V.V. [DNA melting data processing techniques development]. *Nauchnoe Priborostroenie* [Scientific Instrumentation], 2017, vol. 27, no. 1, pp. 83–89. Doi: 10.18358/np-27-1-i8389. (In Russ.).
9. Belov D.A., Korneva N.A., Al'deekova A.C., Belov Yu.V., Kiselev I.G. [Genetic analyzer resolution increasing at DNA melting temperature determination]. *Nauchnoe Priborostroenie* [Scientific Instrumentation], 2016, vol. 26, no. 2, pp. 17–22. Doi: 10.18358/np-26-2-i1722. (In Russ.).
10. Nikitina D.I., Maretina M.A., Egorova A.A., Maslennikov A.B., Kiselev A.V. [Use of the high-allowing analysis of curves of melt of DNA in diagnosis of hereditary diseases]. *Medizinskaya genetika* [Medical genetics], 2017, vol. 16, no. 5, pp. 26–33. (In Russ.).
11. Chimenko V.I. *Sluchaynye dannye: struktura i analiz* [Accidental data: structure and analysis]. Moscow, Technosfera Publ., 2017, 423 p. (In Russ.).
12. Petrov A.I. *Issledovanie i prakticheskaya realizatsiya programmno-apparatnykh sredstv provedeniya polimeraznoy zepnoy reaktsii s nablyudeniem v real'nom vremeni* [Research and implementation of software and hardware tools of carrying out polymerase chain reaction with observation in real time]. Diss. kand tekhn. nauk, Saint-Petersburg, 2016. (In Russ.).
13. Belov D.A., Belov Yu.V., Kurochkin V.E. [New method of DNA melting signal treatment]. *Nauchnoe Priborostroenie* [Scientific Instrumentation], 2018, vol. 28, no. 1, pp. 3–10. Doi: 10.18358/np-28-1-i310. (In Russ.).
14. Mudrov A.E. *Chislennyye metody dlya PEVM na yazykakh Beysik, Fortran i Paskal'* [Numerical methods for PEVM in the BASIC, FORTRAN and Pascal languages]. Tomsk, MP "RASKO", 1991. 272 p. (In Russ.).
15. Lizunova N.A., Shkroba S.P. *Matrizy i sistemy lineynykh*

uravneniy [Matrixes and linear equation systems].
Moscow, Fizmatlit Publ., 2007. 171 p. (In Russ.).

16. Bardin B.V. [Fast algorithm of median filtering]. *Nauchnoe Priborostroenie* [Scientific Instrumentation], 2011,

vol. 21, no. 3, pp. 135–139. (In Russ.). URL:
<http://213.170.69.26/en/mag/2011/abst3.php#abst16>

Contacts: *Belov Dmitriy Anatol'evich*,
onoff_10@mail.ru

Article received in edition: 16.04.2018