

УДК 543.426; 543.9

© А. С. Альдекеева, Д. А. Белов, Ю. В. Белов, А. Л. Широкоград, 2019

**РАЗРАБОТКА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ВЕРСИИ
ПРОГРАММНОГО ОБЕСПЕЧЕНИЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО
ПЦР-АНАЛИЗА**

В настоящей статье приведены результаты использования экспериментальной версии программного обеспечения количественного анализа для анализаторов нуклеиновых кислот АНК-32, АНК-48 и АНК-96, разработанной на основе нового способа автоматического определения порогового цикла C_t . Этот способ основан на аппроксимации зависимости сигнала ПЦР-РВ полиномом 3-й степени. Выполнена экспериментальная проверка погрешности калибровки при количественном ПЦР-анализе.

Кл. сл.: ДНК, анализатор нуклеиновых кислот, сигналы ПЦР-РВ, пороговый цикл

ВВЕДЕНИЕ

Количественный анализ методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-РВ) традиционно выполняется методом сравнения значений пороговых циклов C_t анализируемых и калибровочных образцов. При этом достигается широкий линейный диапазон при рекордно низких погрешностях, что позволяет рассматривать данный метод в качестве приоритетного метода определения концентрации ДНК/РНК в исследуемых образцах [1].

Ранее в наших работах [2–4] был выполнен практический анализ погрешностей количественных измерений при различных способах расчета порогового цикла.

В известной программе ANK_Shell для анализаторов АНК при определении величины C_t используются ручные операции: фильтрация, привязка нулю, привязка к максимуму, выбор уровня сравнения сигналов.

В настоящей статье приведены результаты разработки экспериментальной версии программного обеспечения с условным названием ANK_Cycles, в которой определение C_t выполняется полностью в автоматическом режиме без использования ручных операций. Сравниваются результаты по ANK_Shell (они маркированы нижним индексом S) и ANK_Cycles (индексированы C).

Для получения исходных сигналов ПЦР-РВ использовался калибровочный образец "КО-GTS 40-3-2-10%" из набора реагентов "Соля GTS 40-3-2 количество" производства ЗАО "СИНТОЛ" (Москва). Путем разбавления получены образцы с условной концентрацией ДНК натуральной сои $M = 540, 180, 60$ и 20 нг/мкл и концентрацией ДНК генетически модифицированной сои линии 40-3-2

соответственно в 9 раз меньше.

Для выполнения ПЦР-РВ был использован анализатор АНК-32, который серийно выпускается в ИАП РАН. Устройства "АНК" и "АНК-М" (АНК-32 и АНК-48) внесены в Государственный реестр средств измерения приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии (Росстандарт) № 381 от 26.02.2018 г. "Об утверждении типов средств измерения" (регистрационный № 70436-18, методика поверки "МП 209-47-2017").

Исходные данные были получены для ДНК натуральной сои по каналу флуоресценции R6G, а для ДНК генетически модифицированной сои — по каналу флуоресценции ROX. При дальнейших расчетах были использованы усредненные исходные данные от трех пробирок с одинаковой концентрацией ДНК M .

В инструкции по применению набора реагентов "Соля GTS 40-3-2 количество" строится график (калибровочная прямая) зависимости разности пороговых циклов в каналах флуоресценции ROX и R6G для образцов ДНК генетически модифицированной сои и образцов ДНК натуральной сои с относительной концентрацией КО — 0.1, КО — 1 и КО — 10 %. После построения линии тренда определяется уравнение калибровочной прямой и коэффициент корреляции R^2 , значение которого должно быть не ниже 0.98. При анализе возможно определение только относительной концентрации исследуемых образцов.

В настоящей статье, согласно методике поверки "МП 209-47-2017", построения графиков калибровочных образцов выполняются отдельно для образцов ДНК генетически модифицированной сои и образцов ДНК натуральной сои.

ПОСТРОЕНИЕ ГРАФИКОВ КАЛИБРОВОЧНЫХ ОБРАЗЦОВ. РАСЧЕТ ПОГРЕШНОСТЕЙ ИЗМЕРЕНИЯ ПОРОГОВЫХ ЦИКЛОВ С ПОМОЩЬЮ ПРОГРАММНОГО ОБЕСПЕЧЕНИЯ ANK_Shell

При проведении ПЦР были использованы по 3 пробирки с каждой концентрацией M калибровочного образца "КО-GTS 40-3-2-10%".

Параметры ПЦР: выдержка при температуре 95 °C — 300 с, 50 циклов: 95 °C — 15 с и 59 °C — 40 с.

С помощью программы ANK_Shell вручную обрабатывались исходные данные ПЦР. В качестве примера на рис. 1 приведены исходные данные ПЦР, полученные для ДНК генетически модифи-

цированной сои по каналу флуоресценции ROX. Для привязки к нулю выбран диапазон усреднения 15–25 е.п.ц. (единиц пороговых циклов). Для привязки к максимуму на уровне 1000 относительных единиц флуоресценции (о.е.ф.) был выбран диапазон усреднения 45–50 е.п.ц. Пороговые циклы определялись при уровне сигналов 500 о.е.ф. Этот уровень приблизительно соответствует точке перегиба и концу участка экспоненциального роста флуоресценции. При таком уровне обеспечивается минимальное влияние шумов детектора на погрешности измерения.

Результаты обработки исходных данных ПЦР, полученных для ДНК генетически модифицированной сои по каналу флуоресценции ROX,

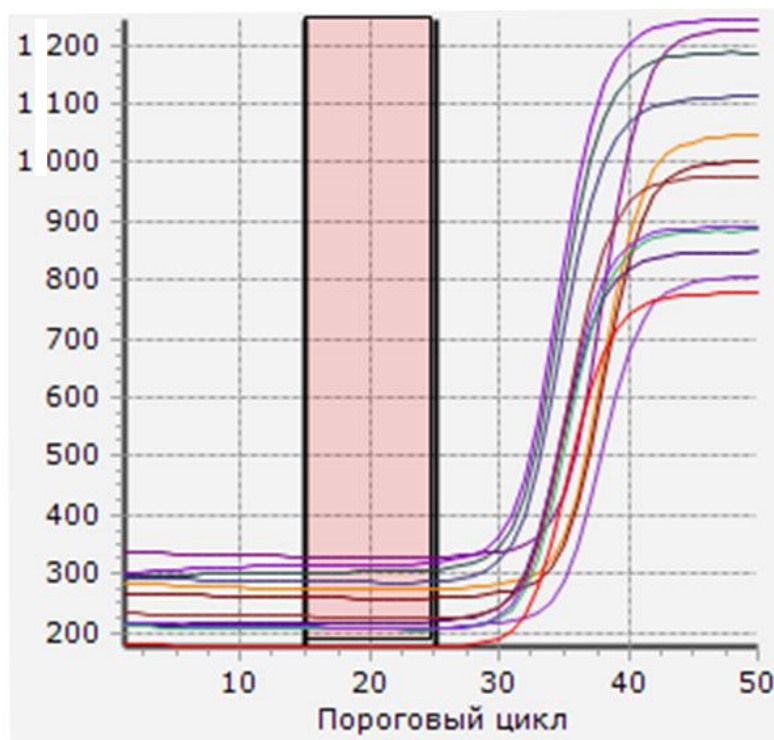


Рис. 1. Графики флуоресценции генетически модифицированной сои. Вертикальная ось — относительные единицы флуоресценции

Табл. 1. Величины C_t и СКО по каналу флуоресценции ROX

M	$\lg M$	$C_{t, \text{ср}}$	$C_{t, \text{р}}$	$C_{t, \text{ср}} - C_{t, \text{р}}$	СКО _S	R^2_S
1	2	3	4	5	6	7
60	1.78	32.39	32.44	-0.053	0.083	0.9972
20	1.30	33.97	33.85	0.125		
6.67	0.82	35.15	35.25	-0.094		
2.22	0.35	36.67	36.65	0.020		

приведены в табл. 1. В столбце 1 приведены значения условной концентрации ДНК M (нг/мкл), в столбце 2 — значения десятичного логарифма величины M . В столбце 3 — средние значения измеренных пороговых циклов $C_{t, \text{cp}}$ трех пробирок с одинаковой концентрацией, они были использованы для построения калибровочной прямой.

Линия тренда построена с помощью программы Excel на графике зависимости $C_{t, \text{cp}}$ от $\lg M$, ее аналитическое выражение: $y = -2.939x + 37.669$, коэффициент корреляции $R^2_S = 0.9972$.

В столбце 4 приведены средние значения пороговых циклов $C_{t, \text{p}}$, вычисленные на основе аналитического выражения линии тренда.

Величины $C_{t, \text{cp}} - C_{t, \text{p}}$ в столбце 5 характеризуют отклонения измеренных пороговых циклов $C_{t, \text{cp}}$ от линии тренда, в столбце 6 определено значение $\text{СКО}_S = 0.083$ е.п.ц.

В табл. 2 приведены результаты обработки исходных данных ПЦР, полученных для ДНК натуральной сои по каналу флуоресценции R6G.

Линия тренда построена на графике зависимости $C_{t, \text{cp}}$ от $\lg M$, ее аналитическое выражение: $y = -3.008x + 37.488$. В табл. 2 приведены значения $\text{СКО}_S = 0.060$ е.п.ц. и коэффициента корреляции $R^2_S = 0.9986$.

Значения среднеквадратического отклонения (СКО) средних значений измеренных пороговых циклов $C_{t, \text{cp}}$ от расчетных пороговых циклов $C_{t, \text{p}}$, а также значения коэффициента корреляции R^2 приняты в качестве характеристик случайных погрешностей измерения пороговых циклов.

ОСОБЕННОСТИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПОРОГОВЫХ ЦИКЛОВ С ПОМОЩЬЮ ПРОГРАММНОГО ОБЕСПЕЧЕНИЯ ANK_Cycles

В настоящей статье предложена методика аппроксимации сигналов с помощью модели на основе полинома 3-й степени, приведенной в нашей работе [5], по формуле (1):

$$F_{Ci} = f_0 + f_1 C_i + f_2 C_i^2 + f_3 C_i^3, \quad (1)$$

где F_{Ci} — относительная величина интенсивности флуоресценции при каждом температурном цикле C_i ; $f_0, \dots, f_3$ — коэффициенты при степенных слагаемых полинома, значения которых вычисляются по методу наименьших квадратов (МНК) [6, 7].

Можно отметить подобие графиков сигналов ПЦР и графиков сигналов плавления ДНК, поэтому возможно применение этой модели для двух целей: определения величин T_m и C_t .

Минимум суммы квадратов Q отклонений модели F_{Ci} от экспериментальных данных F_i при температурных циклах C_i определяется из условий равенства нулю частных производных функции F_{Ci} по переменным $f_0, \dots, f_3$ по формуле (2)

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

Коэффициенты $f_0, \dots, f_3$ вычисляются матричным методом. Вычисленные коэффициенты используются для получения непрерывных аппроксимирующих функций первой и второй производных сигналов флуоресценции $F_{C'}$ и $F_{C''}$:

$$F_{C'} = f_1 + 2f_2 C + 3f_3 C^2, \quad (3)$$

$$F_{C''} = 2f_2 + 6f_3 C. \quad (4)$$

Можно отметить особенности этой модели: значение флуоресценции, соответствующее положению на оси температурных циклов точки $F_{C''} = 0$, соответствует максимуму первой производной и значению точки перегиба модельной функции. Поэтому в качестве величины порогового цикла C_t предлагается принять дробную величину цикла на оси температурных циклов при $F_{C''} = 0$ по формуле (5):

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

В предлагаемой модели на основе полинома 3-й степени используется ограниченный диапазон аппроксимации сигналов. Для определения диапазона аппроксимации сырые данные дважды дифференцируются по температуре. В результате дифференцирования значительно ухудшается отношение

Табл. 2. Величины C_t и СКО по каналу флуоресценции R6G

M	$\lg M$	$C_{t, \text{cp}}$	$C_{t, \text{p}}$	$C_{t, \text{cp}} - C_{t, \text{p}}$	СКО_S	R^2_S
1	2	3	4	5	6	7
540	2.73	29.32	29.27	0.050	0.060	0.9986
180	2.26	30.67	30.71	-0.035		
60	1.78	32.06	32.14	-0.080		
20	1.30	33.64	33.58	0.065		

сигнала к шуму. Поэтому для повышения отношения сигнала к шуму применены фильтры для первой и второй производных зависимости сигналов ПЦР, в частности фильтр скользящего среднего и медианный фильтр.

Поскольку фильтры использованы только для определения диапазона аппроксимации, то они не влияют на сигналы ПЦР, которые используются для построения модели на основе полинома 3-й степени.

В качестве левой границы диапазона аппроксимации сигналов ПЦР для каждой пробы автоматически принимается максимальное значение второй производной, а в качестве правой границы диапазона — минимальное значение второй производной сигналов ПЦР. Такой диапазон соответствует условию: значения отношения сигналов к шуму для первой производной близки к максимальным значениям, поскольку границы диапазона аппроксимации соответствуют точкам перегиба графика первой производной сигналов ПЦР.

За счет ограничения диапазона аппроксимации сигналов ПЦР достигается возможность использовать модель на основе полинома 3-й степени и автоматически определять четыре параметра полинома и величину C_t .

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ПРОВЕРКА ПРОГРАММНОГО ОБЕСПЕЧЕНИЯ ANK_Cycles

На рис. 2 изображена левая часть окна на экране компьютера для выбора параметров работы экспериментальной версии программы ANK_Cycles. Возможен выбор анализируемых пробирок для вывода исходных графиков, выбор диапазона (в приведенном примере 10–50 циклов) и выбор фильтров для сглаживания шума: скользящего среднего по 3 или 5 точкам (Ск.ср.3 и Ск.ср.5), медианы по 3 точкам (Мед3) или Савицкого—Голея (СГ).

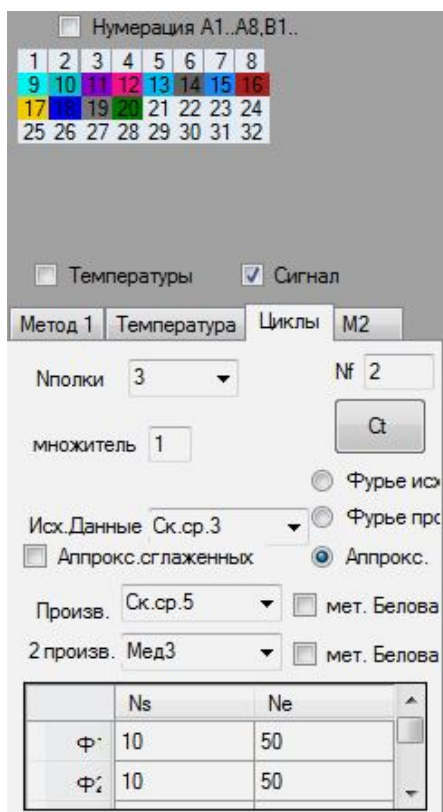


Рис. 2. Окно выбора параметров для просмотра и обработки сигналов ПЦР

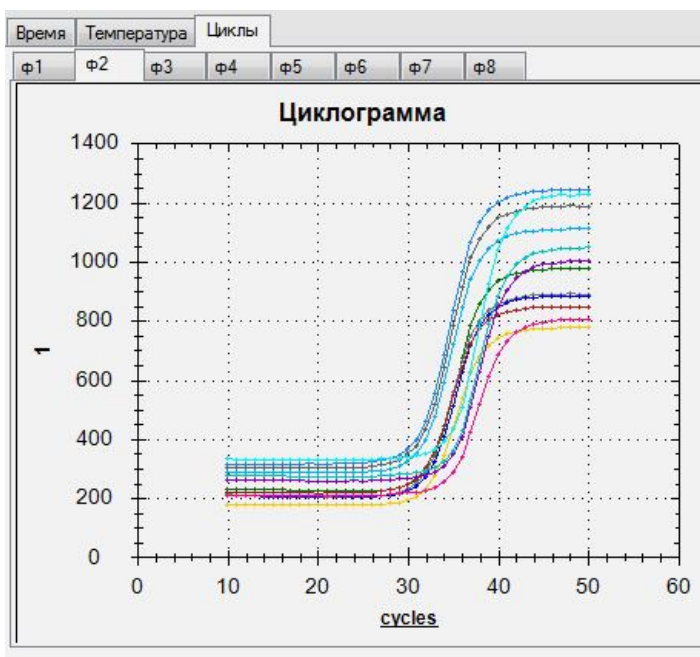


Рис. 3. Окно с графиками сигналов ПЦР. Горизонтальная ось — циклы, вертикальная ось — относительные единицы флуоресценции

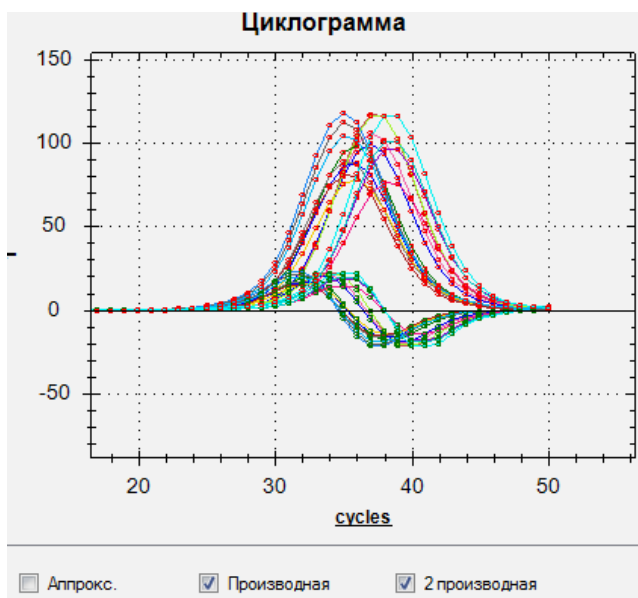


Рис. 4. Активное окно с графиками 1-х производных и 2-х производных сигналов ПЦР. Вертикальная ось — относительные единицы флуоресценции

На рис. 3 изображена правая часть активного окна, в котором выводятся графики ПЦР всех проб в виде точек с наложением графиков аппроксимации.

На рис. 4 изображена правая часть активного окна на экране компьютера, в котором приведены графики первых производных (верхние) и графики вторых производных сигналов ПЦР (нижние).

МЕТОДИКА ПОСТРОЕНИЯ КАЛИБРОВОЧНОЙ ПРЯМОЙ С ПОМОЩЬЮ ПРОГРАММНОГО ОБЕСПЕЧЕНИЯ ANK_Cycles

В результате автоматической обработки исходных данных ПЦР с помощью программного обеспечения ANK_Cycles были получены пороговые циклы C_t образцов генетически модифицированной сои по каналу флуоресценции ROX и натуральной сои по каналу флуоресценции R6G от 12 пробирок. Для построения калибровочной прямой были использованы средние значения измеренных пороговых циклов $C_{t, \text{ср}}$ 3 пробирок с одинаковой концентрацией M .

Результаты построения калибровочной прямой и расчета погрешностей измерения пороговых циклов для ДНК генетически модифицированной сои по каналу флуоресценции ROX приведены в табл. 3.

Табл. 3. Величины C_t и СКО по каналу флуоресценции ROX (методика с ANK_Cycles)

M	$\lg M$	$C_{t, \text{ср}}$	$C_{t, \text{р}}$	$C_{t, \text{ср}} - C_{t, \text{р}}$	СКО _C	R^2_C
1	2	3	4	5	6	7
60	1.78	32.29	32.34	-0.046	0.077	0.9977
20	1.30	33.88	33.76	0.115		
6.67	0.82	35.10	35.19	-0.089		
2.22	0.35	36.63	36.61	0.022		

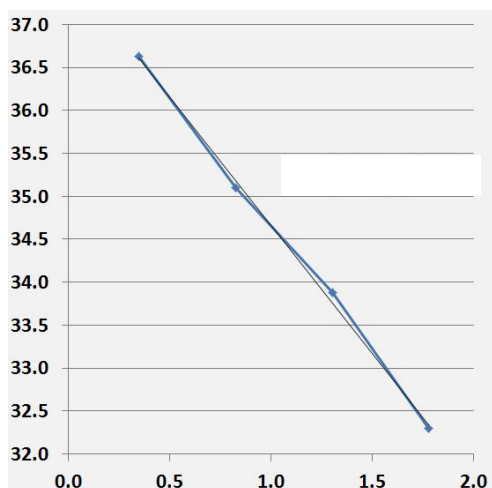


Рис. 5. График зависимости $C_{t, \text{ср}}$ (единиц пороговых циклов) от $\lg M$ и линия тренда $y = 2.982x + 37.643$ ($R^2 = 0.9977$)

В столбце 1 приведены значения условной концентрации ДНК M (нг/мкл), в столбце 2 — значения десятичного логарифма величины M , в столбце 3 — средние значения измеренных пороговых циклов $C_{t, \text{cp}}$ трех пробирок с одинаковой концентрацией.

На рис. 5 с помощью программы Excel построен график калибровочной линии, выражающей зависимость величин $C_{t, \text{cp}}$ от величин $\lg M$, и линия тренда.

Аналитическое выражение линии тренда выражено по формуле (6):

$$C_t = -2.982 \lg M + 37.643. \quad (6)$$

Определены значения $\text{СКО}_C = 0.077$ е.п.ц. и коэффициента корреляции $R^2_C = 0.9977$.

В табл. 4 приведены результаты построения калибровочной прямой и расчета погрешностей измерения пороговых циклов для ДНК натуральной сои по каналу флуоресценции R6G.

В столбце 1 приведены значения условной концентрации ДНК натуральной сои M (нг/мкл), в столбце 2 — значения десятичного логарифма величины M , в столбце 3 — средние значения измеренных пороговых циклов $C_{t, \text{cp}}$ трех пробирок с одинаковой концентрацией.

Путем использования аналитического выражения линии тренда $y = -3.107 x + 36.182$ с помощью программы Excel в столбце 4 получены расчетные значения пороговых циклов $C_{t, \text{p}}$, соответствующие величинам $\lg M$. Определены значения $\text{СКО}_C = 0.059$ е.п.ц. и коэффициент корреляции $R^2_C = 0.9988$.

ОЦЕНКА ПОГРЕШНОСТЕЙ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ПОРОГОВЫХ ЦИКЛОВ

Оценка погрешностей результатов определения пороговых циклов с помощью программного обеспечения ANK_Cycles (индекс C) выполнена путем сравнения с погрешностями выполнения пороговых циклов с помощью известного программного обеспечения ANK_Shell (индекс S).

Основные результаты по каналу флуоресценции ROX:

$\text{СКО}_C = 0.077$ е.п.ц.; $\text{СКО}_S = 0.083$ е.п.ц.; $R^2_C = 0.9977$ и $R^2_S = 0.9972$.

Основные результаты по каналу флуоресценции R6G:

$\text{СКО}_C = 0.059$ е.п.ц.; $\text{СКО}_S = 0.060$ е.п.ц.; $R^2_C = 0.9988$ и $R^2_S = 0.9986$.

Сравнение результатов определения величин СКО и R^2 позволяет сделать следующие выводы.

– Величины СКО , определяющие характеристики случайных погрешностей измерения величин C_t при 4 концентрациях образцов генетически модифицированной сои и натуральной сои, при использовании программного обеспечения ANK_Cycles имеют значения меньше, чем при использовании программного обеспечения ANK_Shell (наилучшее значение $\text{СКО} = 0$ соответствует нулевым случайным погрешностям).

– Величины R^2 , также характеризующие случайные погрешности определения величин C_t при 4 концентрациях образцов генетически модифицированной сои и натуральной сои, при использовании программного обеспечения ANK_Cycles имеют значения больше, чем при использовании программного обеспечения ANK_Shell (наилучшее значение $R^2 = 1$ соответствует нулевым случайным погрешностям).

– Программное обеспечение ANK_Cycles обеспечивает меньшие случайные погрешности определения величин C_t по сравнению с программным обеспечением ANK_Shell.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Показано, что за счет применения разработанного программного обеспечения ANK_Cycles может быть достигнуто уменьшение случайной погрешности определения величин C_t при построении калибровочных графиков для количественных измерений (в приведенном примере СКО_C — не более 0.077 е.п.ц.).

Экспериментальная версия программного обеспечения ANK_Cycles разработана для анализаторов нуклеиновых кислот АНК-32, АНК-48 и экспериментального образца АНК-96.

Табл. 4. Величины C_t и СКО по каналу флуоресценции R6G (методика с ANK_Cycles)

M	$\lg M$	$C_{t, \text{cp}}$	$C_{t, \text{p}}$	$C_{t, \text{cp}} - C_{t, \text{p}}$	СКО_C	R^2_C
1	2	3	4	5	6	7
540	2.73	28.83	28.77	0.059	0.059	0,9988
180	2.26	30.19	30.25	-0.062		
60	1.78	31.68	31.74	-0.056		
20	1.30	33.27	33.22	0.057		

Преимущество разработанной экспериментальной версии программного обеспечения ANK_Cycles — полная автоматизация вычислений.

Авторы выражают заинтересованность в проверке программного обеспечения на многочисленных реальных данных и приглашают пользователей анализаторов нуклеиновых кислот АНК-32, АНК-48 к сотрудничеству. Для этого исходные данные, полученные при ПЦР-РВ с расширением .dapk, необходимо прислать по электронному адресу, приведенному в конце статьи. Авторы в ответном письме приложат результаты обработки в графическом и табличном виде.

Авторы выражают благодарность сотрудникам ЗАО "СИНТОЛ" (Москва) за предоставленные образцы, необходимые для получения исходных данных количественного ПЦР-анализа.

Работа выполнена в ИАП РАН в рамках государственного задания № 075-00780-19-00 Министерства науки и высшего образования РФ по теме № 0074-2019-0013.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Белов Ю.В., Петров А.И., Лавров В.В., Курочкин В.Е. Особенности количественных измерений содержания нуклеиновых кислот методом полимеразной цепной реакции в реальном времени // Научное приборостроение. 2011. Т. 21, № 1. С. 44–49. URL: <http://iairas.ru/mag/2011/abst1.php#abst4>
2. Белов Ю.В., Петров А.И., Лавров В.В., Курочкин В.Е. Изучение влияния шумов детектора на погрешности количественных анализов нуклеиновых кислот на приборах ПЦР-РВ // Научное приборостроение. 2011. Т. 21, № 2. С. 27–33. URL: <http://iairas.ru/mag/2011/abst2.php#abst4>
3. Белов Ю.В., Петров А.И., Лавров В.В., Курочкин В.Е.

Оптимизация параметров сигмоидальной функции при моделировании сигналов ПЦР в реальном времени // Научное приборостроение. 2011. Т. 21, № 3. С. 130–134.

URL: <http://iairas.ru/mag/2011/abst3.php#abst15>

4. Белов Ю.В., Петров А.И., Курочкин В.Е. Исследование погрешностей моделирования сигмоидальной функцией сигналов полимеразной цепной реакции в реальном времени // Научное приборостроение. 2011. Т. 21, № 4. С. 28–34. URL: <http://iairas.ru/mag/2011/abst4.php#abst3>
5. 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://iairas.ru/mag/2018/abst1.php#abst1>
6. Мудров А.Е. Численные методы для ПЭВМ на языках Бейсик, Фортран и Паскаль. Томск: МП "РАСКО", 1991. 272 с.
7. Лизунова Н.А., Шкроба С.П. Матрицы и системы линейных уравнений. М.: Физматлит, 2007. 171 с.

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

Контакты: Белов Дмитрий Анатольевич,
onoff_10@mail.ru

Материал поступил в редакцию 26.04.2019

DEVELOPMENT OF AN EXPERIMENTAL VERSION OF QUANTITATIVE PCR ANALYSIS SOFTWARE

A. S. Al'dekeeva, D. A. Belov, Yu. V. Belov, A. L. Shirokorad

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

This article presents the results of using the experimental version of the quantitative analysis software ANK_Cycles for the nucleic acid analyzers ANK-32, ANC-48 and ANK-96. Software was developed on the basis of a new method for automatic detection of the threshold cycle C_t . This method is based on approximation of the dependence of the Real Time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) signal by a polynomial of the 3rd degree. The experimental check of calibration error in quantitative PCR-analysis is carried out, and the results were compared with similar results obtained by the use of the known measurement technology (ANK_Shell software), which involves performing a number of manual operations. Measurements and comparisons were made in the fluorescence channels ROX and R6G with the use of samples of natural soybeans and genetically modified ones from the collection of reagents "Soybean GTS 40-3-2 quantity" produced by JSC "SINTOL" (Moscow).

Keywords: DNA, nucleic acid analyzer, RT-PCR signals, threshold cycle

Fig. 1. Graphs of genetically modified soybeans fluorescence. Fluorescence relative units are marked along the vertical axis

Fig. 2. Interface window for selecting parameters for viewing and processing polymerase chain reaction (PCR) signals

Fig. 3. Interface window with graphs of PCR signals. The horizontal axis is cycles, the vertical axis is relative fluorescence units

Fig. 4. Active interface window with 1st and 2nd derivative graphs of PCR. Vertical axis is relative fluorescence units

Fig. 5. Graph of dependence of $C_{t,cp}$ (units of threshold cycles) on $\lg M$ and trend line $y = 2.982x + 37.643$ ($R^2 = 0.9977$)

Table 1. Values of r.m.s. deviations and cycle thresholds along the ROX fluorescence channel

Table 2. Values of r.m.s. deviations and cycle thresholds along the R6G fluorescence channel

Table 3. Values of r.m.s. deviations and cycle thresholds along the ROX fluorescence channel (values obtained with the use of ANK_Cycles software)

Table 4. Values of r.m.s. deviations and cycle thresholds along the R6G fluorescence channel (values obtained with the use of ANK_Cycles software)

REFERENCES

1. Belov Yu.V., Petrov A.I., Lavrov V.V., Kurochkin V.E. [Optimisation of RT-PCR nucleic acid quantitative analysis]. *Nauchnoe Priborostroenie* [Scientific Instrumentation], 2011, vol. 21, no. 1, pp. 44–49. (In Russ.). URL: <http://iairas.ru/en/mag/2011/abst1.php#abst4>
2. Belov Yu.V., Petrov A.I., Lavrov V.V., Kurochkin V.E. [Influence of detector noise on errors of quantitative analysis of nucleic acids using real-time PCR]. *Nauchnoe Priborostroenie* [Scientific Instrumentation], 2011, vol. 21, no. 2, pp. 27–33. (In Russ.). URL: <http://iairas.ru/en/mag/2011/abst2.php#abst4>
3. Belov Yu.V., Petrov A.I., Lavrov V.V., Kurochkin V.E. [Optimization of sigmoid function parameters in real-time PCR signals modeling]. *Nauchnoe Priborostroenie* [Scientific Instrumentation], 2011, vol. 21, no. 3, pp. 130–134. (In Russ.). URL: <http://iairas.ru/en/mag/2011/abst3.php#abst15>
4. Belov Yu.V., Petrov A.I., Kurochkin V.E. [Error analysis of real time PCR signals modeled by sigmoid function]. *Nauchnoe Priborostroenie* [Scientific Instrumentation], 2011, vol. 21, no. 4, pp. 28–34. (In Russ.). URL: <http://iairas.ru/en/mag/2011/abst4.php#abst3>

5. Belov D.A., Belov Yu.V., Kurochkin V.E. [New method of DNA melting signal treatment]. *Nauchnoe Pribo-rostroenie* [Scientific Instrumentation], 2018, vol. 28, no. 1, pp. 3–10. DOI: 10.18358/np-28-1-i310 (In Russ.).
6. Mudrov A.E. *Chislennyye metody dlya PEVM na yazykah Bejsik, Fortran i Paskal'* [Numerical methods for PC in Basic, Fortran and Pascal]. Tomsk, PASCO Publ., 1991. 272 p. (In Russ.).
7. Lizunova N.A., Shkroba S.P. *Matricy i sistemy linejnyh uravnenij* [Matrices and systems of linear equations]. Moscow, Fizmatlit Publ., 2007. 171 p. (In Russ.).

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

Article received by editing board on 26.04.2019