УДК 543.426.1; 57.088

© **В. Е. Курочкин, Д. А. Белов, Ю. В. Белов, А. Н. Зубик**, 2020

ОПРЕДЕЛЕНИЕ МОДЕЛЬНЫХ КОНСТАНТ ПРИ ВЫЧИСЛЕНИИ ТЕМПЕРАТУРЫ ПЛАВЛЕНИЯ ДНК

В настоящей статье описаны факторы, влияющие на величину определяемой температуры плавления ДНК T_m, оценена степень их влияния. Выполнен обзор существующих моделей для вычисления температуры плавления ДНК, выявлено значительное расхождение результатов применения моделей и экспериментальных данных. Предложено применение упрощенных моделей, учитывающих зависимость температуры T_m от некоторых факторов при неизменных иных факторах. В качестве примера приведена упрощенная модель, учитывающая зависимость от длины фрагмента ДНК и содержания GC-пар нуклеотидов. Описана методика определения модельных констант для вычисления температуры плавления ДНК на основе анализа результатов экспериментов и данных из известных литературных источников. Отклонение температуры плавления T_m при использовании модели, уточненной по экспериментальным данным, не превышает 0.29 °C, значение СКО составляет 0.13 °C.

Кл. сл.: анализатор нуклеиновых кислот, ПЦР в реальном времени, температура плавления ДНК

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что генетическая информация закодирована в ДНК в виде двух полимерных цепей, соединенных водородными связями. Цепи образуют двойную спираль, содержащую азотистые основания-нуклеотиды: аденин (A), гуанин (G), тимин (T) и цитозин (C).

Согласно правилу комплементарности нуклеотиды A и G первой цепи связаны соответственно с нуклеотидами T и C второй цепи [1].

Физический процесс плавления молекулы ДНК возникает при повышении температуры и связан с переходом "спираль — клубок". Термодинамическая теория перехода ДНК "спираль — клубок" основана на учете разности свободных энергий спирального и клубкообразного состояний [2]. Процесс плавления сопровождается значительным изменением физических свойств исследуемого раствора ДНК, позволяющим проводить анализ: поглощение в ультрафиолетовой части спектра (260 нм) возрастает на 30–40 % [3], а вязкость раствора снижается в 12 раз [4].

Современный метод анализа кривых плавления молекулы ДНК реализуется на анализаторах нуклеиновых кислот после ПЦР в реальном времени с применением флуоресцентных красителей, интенсивность которых может изменяться более чем в 100 раз [5]. При этом получаются кривые плавления продуктов амплификации, представляющие собой зависимость измеренной величины флуоресцентного отклика от температуры образца. При вторичной обработке каждой кривой плавления определяется температура плавления ДНК T_m как точка перегиба этой кривой. Значение температуры T_m соответствует энергетическому состоянию, при котором половина молекул ДНК находится в спиральном, а другая половина — в клубкообразном состоянии [3].

Температура плавления T_m зависит от состава фрагмента ДНК, это объясняется энергетическим состоянием ДНК: в паре нуклеотидов GC имеются три водородные связи, в паре AT — только две. Поэтому чем больше пар GC в ДНК, тем более она "тугоплавка" [6]. В 1962 г. на основе анализа нескольких десятков образцов [7] была выявлена линейная зависимость между температурой T_m и содержанием GC-пар нуклеотидов [G + C]:

$$T_m = 69.3 + 0.41[G + C], \quad (1)$$

где [G + C] — содержание нуклеотидов G и C в продукте ПЦР (%). В этой и следующих моделях константы имеют единицы измерения, обеспечивающие единство размерности всех слагаемых в этих моделях.

На значение температуры T_m оказывают влияние и другие факторы: например, температура плавления фрагмента ДНК обратно пропорционально зависит от длины этого фрагмента [8, 9] и является линейной функцией логарифма концентрации ионов металлов в анализируемом растворе [10, 11]. Эти факторы учтены в следующей модели [12]:

$$T_m = 81.5 + 16.6 \lg([K^+]) + 0.41\,[G + C] - 675 / L_p, \quad (2)$$

где $[K^+]$ — концентрация ионов калия (моль/л); L_p — длина продукта (пар нуклеотидов, п. н).

Известна программа Tm_Tool [13] для расчета температуры плавления ДНК. В описании программы представлено следующее уравнение для последовательностей ДНК, длиннее чем 50 п. н., при pH раствора от 5 до 9:

$$T_m = 81.5 + 41\,(yG + zC) / (wA + xT + yG + zC) - \\ - 500 / (wA + xT + yG + zC) + \\ +16.6\,\log_{10}([Na^+]) - 0.62\,F, \quad (3)$$

где yG, zC, wA и xT — количество соответствующих нуклеотидов; $[Na^+]$ — концентрация в растворе ионов натрия (моль/л); F — процентная концентрация формамида (%). Видно, что увеличение концентрации формамида линейно снижает температуру T_m [14].

Температура плавления зависит также от pH среды, значительно снижаясь при значениях pH ниже 5 и выше 9, что связано с эффектами протонирования и депротонирования азотистых оснований в кислой и щелочной средах [15]. Существенно на значение T_m влияют тип и концентрация флуоресцентного красителя. Так, изменение температуры плавления может достигать (0.7 ± 0.1) °C при использовании красителя SYTO-64 и $(10 \pm \pm 0.02)$ °C при использовании красителя SYBR Green I [16]. Зависимость интенсивности флуоресцентного отклика свободного красителя от температуры [17] также может влиять на значение температуры T_m.

Зависимость температуры T_m от некоторых из описанных выше факторов является линейной только при неизменных других факторах. Например, концентрация формамида может изменять температуру T_m в диапазоне 2.4–2.9 ºC/моль в зависимости от содержания GC-пар нуклеотидов [G + C] [14]. Такая зависимость значительно усложняет модель для вычисления температуры плавления ДНК.

Существующие модели не учитывают всех факторов, влияющих на величину температуры плавления ДНК, погрешность вычисления температуры T_m превышает 1 °C, что является неприемлемым для большого количества прикладных задач [18, 19]. Таким образом, существует необходимость создания новых моделей, позволяющих более точно определять значение температуры T_m при изменении некоторых факторов, например длины фрагментов ДНК и содержания GC-пар нуклеотидов, и неизменных иных факторах.

ПРИМЕР МОДЕЛИРОВАНИЯ ЗАВИСИМОСТИ ВЕЛИЧИНЫ T_m ОТ ДЛИНЫ ФРАГМЕНТОВ ДНК И СОДЕРЖАНИЯ GC-ПАР НУКЛЕОТИДОВ

Формулы (2) и (3) можно представить в виде упрощенной модели, учитывающей изменение значений длины фрагмента ДНК L_p и содержания нуклеотидов [G + C], справедливой для экспериментов с неизменными прочими параметрами:

$$T_{mc_i} = P1 + 0.41\,[G + C] - P2 / L_p. \quad (4)$$

Здесь исходное значение P1 при постоянном составе среды равно сумме $81.5 + 16.6\,\lg [K^+]$ на основании формулы (2) или $81.5 + 16.6\,\lg([Na^+]) - 0.62\,F$, на основании формулы (3).

Значения модельных констант P1 и P2 вычисляются на основе данных, полученных в программе Tm_Tool, по методу наименьших квадратов (МНК) [20, 21]. Определяется сумма квадратов отклонений Q модели T_{mc_i} от экспериментальных данных T_{m_i}:

$$Q = \sum_{i=0}^{n-1} \left(T_{mc_i}\left(L_p, [G+C], P1, P2\right) - T_{m_i} \right)^2, \quad (5)$$

где n — количество измерений.

Минимум суммы квадратов отклонений Q определяется из условий равенства нулю частных производных функции Q путем изменения коэффициентов L_p, [G + C], P1 и P2.

Табл. 1. Оценка отклонения вычисленного значения T_m

№ фрагмента	L_p, п. н.	T_m, °C, по Tm_Tool	T_m, °C, по ф-ле (6) ($T_{m(6)}$)	ΔT_m
1	100	85.69	85.60	–0.09
2	200	87.59	87.80	0.21
3	400	88.91	88.89	–0.02
4	600	89.28	89.26	–0.02
5	800	89.48	89.44	–0.04
6	1000	89.59	89.55	–0.04

В столбце "T_m, °C, по Tm_Tool" табл. 1 представлены значения температуры плавления T_m, рассчитанные с помощью известной программы Tm_Tool при содержании нуклеотидов [G + C] = = 50 % в зависимости от длины фрагментов L_p.

Формула (4), уточненная в программной среде MatLab с помощью функции `regress` по значениям T_m, L_p и [G + C], имеет вид:

$$T_m = 69.5 + 0.41\,[G + C] - 438.4 / L_p. \qquad (6)$$

Для оценки отклонения вычисленной температуры плавления T_m по формуле (6) в столбце $T_{m(6)}$ табл. 1 находятся значения, рассчитанные по этой формуле в зависимости от длины фрагментов L_p. Значение ΔT_m соответствует разности значений "T_m по Tm_Tool" и $T_{m(6)}$.

Максимальное отклонение вычисленной температуры плавления T_m по формуле (6) составляет 0.21 °C, значение СКО составляет 0.05 °C. Для оценки адекватности модели, полученной при использовании программы Tm_Tool, необходимо сравнить ее результаты с результатами эксперимента.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЗНАЧЕНИЙ ТЕМПЕРАТУРЫ ПЛАВЛЕНИЯ ФРАГМЕНТОВ ДНК T_M

Исходные (сырые) данные получены методом анализа кривых плавления на анализаторе нуклеиновых кислот АНК-32, который серийно выпускается в Институте аналитического приборостроения РАН (ИАП РАН).

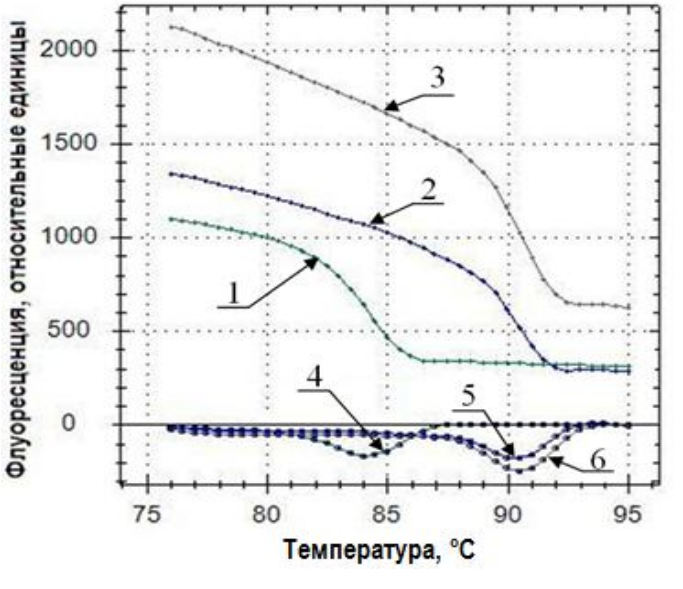
Выполнен трехкратный анализ 3 образцов ампликонов цитокератина (СК-19) в четырехкратном повторении по методике плавления в диапазоне температур образца 70–95 °C с шагом 0.5 °C и длительностью выдержки каждого значения температуры 30 с.

С помощью программы ANK_Melting [22] определены 12 величин T_m каждого образца. Вычислены средние значения T_m каждого образца: 84.30, 90.42 и 90.55 °C. Погрешность определения средней температуры плавления T_m для этих образцов оценена с помощью значения СКО, которое составляет 0.12 °C.

В верхней части рисунка показаны кривые плавления, полученные при анализе трех образцов с разной температурой плавления. В нижней части рисунка показаны производные от этих кривых по температуре.

Средние значения T_m для образцов 1, 2 и 3 приведены в столбце T_{mA} табл. 2. Образцы 1, 2 и 3 имеют соответственно содержание нуклеотидов [G + C], равное 53, 59 и 58 % при длине фрагментов L_p, равной 103, 209 и 309 п. н. соответственно.

Параметры среды в эксперименте соответствуют параметрам, принятым при расчете значений T_m с помощью программы Tm_Tool. Это позволяет оценить соответствие формулы (6) экспериментальным данным. Отклонение вычисленного значения T_m образцов 1, 2 и 3 оказалось значительным и составляет 2.60, 1.45 и 1.09 °C соответственно. Для уточнения предложенной модели предлагается определить модельные константы в соответствии с экспериментальными данными.



Графики плавления (линии 1–3), полученные при анализе трех образцов, и их производные по температуре (линии 4–6)

Табл. 2. Определение модельных констант P1 и P2

№ образца	[G + C], %	L_p, п. н.	$T_{m(7)}$, °C	T_{mA}, °C	ΔT_m
1	53	103	84.37	84.30	0.07
2	59	209	90.14	90.42	–0.29
3	58	309	90.77	90.55	0.22

ОПРЕДЕЛЕНИЯ МОДЕЛЬНЫХ КОНСТАНТ ПРИ ВЫЧИСЛЕНИИ ТЕМПЕРАТУРЫ ПЛАВЛЕНИЯ ФРАГМЕНТОВ ДНК ПО РЕЗУЛЬТАТАМ АНАЛИЗОВ

Значения модельных констант P1 и P2 формулы (6) вычисляются на основе данных T_{mA} по методу наименьших квадратов.

Формула, модельные константы которой определены по экспериментальным данным в программе Matlab, имеет вид:

$$T_m = 69.2 + 0.41\,[G + C] - 671.8/\,L_p. \qquad (7)$$

В столбце $T_{m(7)}$ приведены значения температуры плавления T_m, рассчитанные по формуле (7) в зависимости от величин [G + C] и длины фрагментов L_p. Значение ΔT_m в табл. 2 соответствует разности $T_{m(7)} - T_{mA}$.

Максимальное отклонение вычисленной температуры плавления T_m по формуле (7) соответствует значению 0.29 °C, значение СКО равно 0.13 °C.

Модель обеспечивает возможность сравнивать исследуемые образцы по экспериментальным результатам определения величин T_m. Например, изменение длины фрагмента L_p от 100 до 110 п. н. вызывает изменение T_m на (671.8 / 100) – – (671.8 / 110) = 0.6 °C, а изменение состава [G + C] на 1 % вызывает изменение T_m на 0.41 °C.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Предложено применение упрощенных моделей для вычисления температуры плавления ДНК T_m, учитывающих зависимость от некоторых факторов и справедливых для экспериментов с неизменными прочими факторами. В качестве примера приведена упрощенная модель, учитывающая зависимость от длины фрагмента ДНК и содержания GC-пар нуклеотидов.

Описана методика определения модельных констант для вычисления температуры плавления фрагментов ДНК на основе экспериментальных данных и данных из известных литературных источников.

На анализаторе нуклеиновых кислот АНК-32 проведен трехкратный анализ методом плавления трех известных образцов ДНК с четырехкратным повторением. В результате выполнена оценка погрешности определения средней температуры плавления T_m: значения СКО для этих образцов во всех пробирках — не более 0.12 °C.

Отклонение вычисленной температуры плавления T_m при использовании уточненной по экспериментальным данным модели не превышает 0.29 °C, значение СКО составляет 0.13 °C.

Работа выполнена в ИАП РАН в рамках государственного задания № 075-01073-20-00 Министерства науки и высшего образования РФ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Chargaff E., Lipshitz R., Green C., Hodes M.E.* The composition of the desoxyribonucleic acid of salmon sperm // J. Biol. Chem. 1951. Vol. 192. P. 223–230. PMID 14917668.
2. *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
3. *Wartell R.M., Benight A.S.* Thermal denaturation of DNA molecules: A comparison of theory with experiment // Physics Reports. 1985. Vol. 126. P. 67–107. DOI: 10.1016/0370-1573(85)90060-2
4. *Rice S.A., Doty P.* The Thermal Denaturation of Deoxyribose Nucleic Acid // Journal of American Chemical Society. 1957. Vol. 79. P. 3937–3947. DOI: 10.1021/ja01572a001
5. *Wittwer C.T., Herrmann M.G., Moss A.A., Rasmussen R.P.* Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification // Biotechniques. 1997. Vol. 22. P. 134–138. DOI:10.2144/97221bi01
6. *Marmur J., Doty P.* Heterogeneity in Deoxyribonucleic Acids: I. Dependence on Composition of the Configurational Stability of Deoxyribonucleic Acids // Nature. 1959. Vol. 183, no. 4673. P. 1427–1429. DOI: 10.1038/1831427a0
7. *Marmur J., Doty P.* Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its thermal denaturation temperature // Journal of Molecular Biology. 1962. Vol. 5, no. 1. P. 109–118. DOI: 10.1016/s0022-2836(62)80066-7
8. *Porschke D.* Cooperative non-enzymic base recognition II. Thermodynamics of the helix-coil transition of oligoadenylic + oligouridylic acids // Biopolymers. 1971.

Vol. 10. P. 1989–2013. DOI: 10.1002/bip.360101016
9. *Blake R.D.* Cooperative lengths of DNA during melting // Biopolymers. 1987. Vol. 26. P. 1063–1074. DOI: 10.1002/bip.360260706
10. *Breslauer K.J., Frank R., Blocker H., Marky L.A.* Predicting DNA duplex stability from the base sequence // Proc Natl Acad Sci USA. 1986. Vol. 83. P. 3746–3750. DOI: 10.1073/pnas.83.11.3746
11. *Owczarzy R., You Y., Moreira B.G., Manthey J.A., Huang L., et al.* Effects of sodium ions on DNA duplex oligomers: improved predictions of melting temperatures // Biochemistry. 2004. Vol. 43. P. 3537–3554. DOI: 10.1021/bi034621r
12. *Календарь Р.Н., Сиволап Ю.М.* Полимеразная цепная реакция с произвольными праймерами // Биополимеры и клетка. 1995. 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
13. DNA.UTAH.EDU Software Methods and Equations. URL: https://www.dna.utah.edu/tm/tool.html
14. *Blake R.D., Delcourt S.G.* Thermodynamic effects of formamide on DNA stability // Nucleic Acids Res. 1996. Vol. 24, no. 11. P. 2095–2103. DOI: 10.1093/nar/24.11.2095
15. *Privalov P.L., Ptitsyn O.B., Birshtein T.M.* Determination of stability of the DNA double helix in an aqueous medium // Biopolymers. 1969. Vol. 8, no.5. P. 559–571. DOI: 10.1002/bip.1969.360080502
16. *Gudnason H., Dufva M., Bang D.D., Wolff A.* Comparison of multiple DNA dyes for real-time PCR: effects of dye concentration and sequence composition on DNA amplification and melting temperature // Nucleic Acids Res. 2007. Vol. 35, no. 19. e127. DOI: 10.1093/nar/gkm671
17. *Сочивко Д.Г., Варламов Д.А., Федоров А.А., Курочкин В.Е.* Метод бесконтактного измерения температуры в реакторах полимеразной цепной реакции // Письма в ЖТФ. 2016. Т. 42, вып. 7. С. 53–58. URL: http://journals.ioffe.ru/articles/viewPDF/43031
18. *Ломзов А.А., Пышный Д.В.* Расчет температуры плавления нативных и модифицированных комплексов ДНК при различных концентрациях катионов металлов с помощью расширенной модели конденсации противоионов // Вестник НГУ. Серия: Физика. 2008. Т. 3, № 2. С. 61–75. URL: https://lib.nsu.ru/xmlui/handle/nsu/3282
19. *Vologodskii A., Frank-Kamenetskii M.D.* DNA melting and energetics of the double helix // Physics of Life Reviews. 2018. Vol. 25. P. 1–21. DOI: 10.1016/j.plrev.2017.11.012
20. *Мудров А.Е.* Численные методы для ПЭВМ на языках Бейсик, Фортран и Паскаль. Томск: МП "РАСКО", 1991. 272 с.
21. *Лизунова Н.А., Шкроба С.П.* Матрицы и системы линейных уравнений. М.: ФИЗМАТЛИТ, 2007. 171 с.
22. *Белов Д.А., Белов Ю.В., Широкорад А.Л.* Разработка экспериментальной версии программного обеспечения на основе новой методики определения температуры плавления ДНК // Научное приборостроение. 2018. Т. 28, № 2. С. 11–19. URL: http://iairas.ru/mag/2018/abst2.php#abst2

Институт аналитического приборостроения РАН, Санкт-Петербург

Контакты: *Белов Дмитрий Анатольевич,* onoff_10@mail.ru

Материал поступил в редакцию 02.05.2020

MODEL CONSTANTS DETERMINATION IN THE DNA MELTING TEMPERATURE CALCULATING

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

Institute for Analytical Instrumentation of RAS, Saint Petersburg, Russia

The factors affecting the value of the DNA melting temperature T_m are described and the degree of their influence is estimated in the article. A review of existing models for calculating the DNA melting temperature is carried out, a significant discrepancy between the results of model application and experimental data is revealed. It's proposed to use simplified models that take into account the dependence of the temperature T_m on some factors with other factors unchanged. A simplified model is given as an example, taking into account the dependence on the length of the DNA fragment and the content of GC-pairs of nucleotides. A method for determining model constants for calculating the DNA melting temperature based on the experimental results analysis and data from the known literature is described. The error in calculating the melting temperature T_m when using the model adjusted according to experimental data does not exceed 0.29 °C; the standard deviation is 0.13 °C.

Keywords: nucleic acid analyzer, real-time PCR, DNA melting point

REFERENCES

1. Chargaff E., Lipshitz R., Green C., Hodes M.E. The composition of the desoxyribonucleic acid of salmon sperm. *J. Biol. Chem*., 1951, vol. 192, pp. 223–230. PMID 14917668.
2. Vedenov A.A., Dykhne A.M., Frank-Kamenetskii M.D. [The helix-coil transition in DNA]. *Uspekhi fizicheskih nauk* [Advances in Physical Sciences], 1971, vol. 105, no. 11, pp. 479–519. DOI: 10.3367/UFNr.0105.197111d.0479 (In Russ.).
3. Wartell R.M., Benight A.S. Thermal denaturation of DNA molecules: A comparison of theory with experiment. *Physics Reports*, 1985, vol. 126, pp. 67–107. DOI: 10.1016/0370-1573(85)90060-2
4. Rice S.A., Doty P. The Thermal Denaturation of Deoxyribose Nucleic Acid. *Journal of American Chemical Society*, 1957, vol. 79, pp. 3937–3947. DOI: 10.1021/ja01572a001
5. Wittwer C.T., Herrmann M.G., Moss A.A., Rasmussen R.P. Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques*, 1997, vol. 22, pp. 134–138. DOI:10.2144/97221bi01
6. Marmur J., Doty P. Heterogeneity in Deoxyribonucleic Acids: I. Dependence on Composition of the Configurational Stability of Deoxyribonucleic Acids. *Nature*, 1959, vol. 183, no. 4673, pp. 1427–1429. DOI: 10.1038/1831427a0
7. Marmur J., Doty P. Determination of the base composition of deoxyribonucleic acid from its thermal denaturation temperature. *Journal of Molecular Biology*, 1962, vol. 5, no. 1, pp. 109–118. DOI: 10.1016/s0022-2836(62)80066-7
8. Porschke D. Cooperative non-enzymic base recognition II. Thermodynamics of the helix-coil transition of oligoadenylic + oligouridylic acids. *Biopolymers*, 1971, vol. 10, pp. 1989–2013. DOI: 10.1002/bip.360101016
9. Blake R.D. Cooperative lengths of DNA during melting. *Biopolymers*, 1987, vol. 26, pp. 1063–1074. DOI: 10.1002/bip.360260706
10. Breslauer K.J., Frank R., Blocker H., Marky L.A. Predicting DNA duplex stability from the base sequence. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986, vol. 83, pp. 3746–3750. DOI: 10.1073/pnas.83.11.3746
11. Owczarzy R., You Y., Moreira B.G., Manthey J.A., Huang L., et al. Effects of sodium ions on DNA duplex oligomers: improved predictions of melting temperatures. *Biochemistry*, 2004, vol. 43, pp. 3537–3554. DOI: 10.1021/bi034621r
12. Calendar R.N., Syvolap Yu.M. [Polymerase chain reaction with arbitrary oligonucleotide primers]. *Biopolimery i kletka* [Biopolymers and Cell], 1995, vol. 11, no. 3-4, pp. 55–65. URL: http://www.biopolymers.org.ua/pdf/ru/11/3/055/biopolym.cell-1995-11-3-055-ru.pdf (In Russ.).
13. *DNA.UTAH.EDU Software Methods and Equations*. URL: https://www.dna.utah.edu/tm/tool.html
14. Blake R.D., Delcourt S.G. Thermodynamic effects of formamide on DNA stability. *Nucleic Acids Res*., 1996, vol. 24, no. 11, pp. 2095–2103. DOI: 10.1093/nar/24.11.2095
15. Privalov P.L., Ptitsyn O.B., Birshtein T.M. Determination of stability of the DNA double helix in an aqueous medium. *Biopolymers*, 1969, vol. 8, no.5, pp. 559–571. DOI: 10.1002/bip.1969.360080502
16. Gudnason H., Dufva M., Bang D.D., Wolff A. Comparison of multiple DNA dyes for real-time PCR: effects of dye concentration and sequence composition on DNA amplification and melting temperature. *Nucleic Acids Res*, 2007, vol. 35, no. 19, e127. DOI: 10.1093/nar/gkm671
17. Sochivko D.G., Varlamov D.A., Fedorov A.A., Kurochkin V.E. [Non-contact temperature measurement method in polymerase chain reaction reactors]. *Pis'ma*

v ZHTF [JETP Letters], 2016, vol. 42, no. 7, pp. 53–58. URL: http://journals.ioffe.ru/articles/viewPDF/43031 (In Russ.).
18. Lomzov A.A., Pyshnyj D.V. [Calculation of melting point of native and modified DNA complexes at different concentrations of metal cations using an extended model of counterion condensation]. *Vestnik NGU. Seriya: Fizika* [NSU bulletin. Series: Physics], 2008, vol. 3, no. 2, pp. 61–75.
URL: https://lib.nsu.ru/xmlui/handle/nsu/3282 (In Russ.).
19. Vologodskii A., Frank-Kamenetskii M.D. DNA melting and energetics of the double helix. *Physics of Life Reviews*, 2018, vol. 25, pp. 1–21.
DOI: 10.1016/j.plrev.2017.11.012
20. Mudrov A.E. *Chislennye metody dlya PEVM na yazykah Bejsik, Fortran i Paskal'* [Numerical methods for PEVs in Beisik, Fortran and Pascal]. Tomsk, RASCO Publ., 1991, 272 p. (In Russ.).
21. 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.).
22. Belov D.A., Belov Yu.V., Shirokorad A.L. [Development of the experimental version software, based on the new dna melting temperature determination technique]. *Nauchnoe Priborostroenie* [Scientific Instrumentation], 2018, vol. 28, no. 2, pp. 11–19.DOI: 10.18358/np-28-2-i1119 (In Russ.).

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

Article received by the editorial office on 02.05.2020