

Лабораторная работа № 12

«МЕТОДЫ ЛИНЕАРИЗАЦИИ ФУНКЦИЙ. ОЦЕНКА ПАРАМЕТРОВ ПО ЛИНЕЙНЫМ ЗАВИСИМОСТЯМ»

Целью любого эксперимента является определение качественной и количественной связи между исследуемыми величинами или оценка численного значения какого-либо параметра, что в конечном счете позволяет извлечь из экспериментальных данных биологически значимую информацию об объекте исследования.

Уравнение зависимости между исследуемыми величинами достаточно просто определить, когда эмпирические точки совпадают с прямой линией, т. е. описываются линейным уравнением:

$$Y = ax + b,$$

где a и b – численные коэффициенты, подлежащие определению.

Эти коэффициенты можно определить графически, нанеся результаты эксперимента на график (например, на миллиметровке), а затем провести прямую линию, проходящую ближе всего к нанесенным точкам. По тангенсу угла наклона прямой рассчитывают скорость процесса (параметр a в уравнении), а точка пересечения прямой с вертикальной осью дает величину параметра b . Кроме того, функция и численные коэффициенты могут быть определены с помощью программы электронных таблиц (Microsoft Excel, Libre Office Calc, Gnumeric и др.). Для этого необходимо на графике отложить экспериментальные точки и добавить линию тренда.

Однако процессы, происходящие в живой природе, крайне редко могут быть описаны линейными функциями. Гораздо чаще встречаются нелинейные зависимости: рост культур бактерий или растительных клеток, зависимость скорости катализируемой ферментом реакции от концентрации субстрата, изменение плотности популяции грызунов, насекомых и т. п. Для решения такого рода задач нелинейные зависимости можно преобразовать в линейный вид, т. е. провести их линеаризацию.

Рассмотрим некоторые варианты линеаризации.

1 Линеаризация S-образной кривой

В современной биологии широко используются спектрофотометрические методы количественного определения того или иного соединения, базирующиеся на построении калибровочных кривых по стандартным образцам (растворам с заданной концентрацией изучаемого соединения). Калибровочные кривые позволяют произвести пересчет значений оптической плотности раствора, измеренных на спектрофотометре, в единицы концентрации (рисунок 1).



Рисунок 1 – Калибровочная кривая

Задание 1. Имеются экспериментальные данные зависимости оптической плотности раствора (E_{750}) от концентрации белка (мг/мл) в листьях пшеницы, подвергнутых стрессовым воздействиям:

Концентрация, мг/мл	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,1	0,2
Оптическая плотность, E_{750}	0,065	0,066	0,071	0,087	0,148	0,241	0,269
Концентрация, мг/мл	0,3	0,4	0,5	0,6	0,8	1,0	1,1
Оптическая плотность, E_{750}	0,353	0,456	0,518	0,698	0,803	0,837	0,830

Необходимо определить содержание белка, используя калибровочную кривую, если известно, что измеренная оптическая плотность опытных растворов составляет:

- 0,54 – контроль (20 °С, стандартная влажность);
- 0,36 – при действии избыточного увлажнения (влажность – 98%);
- 0,68 – при действии повышенной температуры (33 °С).

Решение

Для решения данной задачи необходимо найти линейный участок кривой, по нему построить калибровочную зависимость, оценив диапазон измеряемых концентраций в данном конкретном случае, определить концентрацию белка в экспериментальных образцах (листьях пшеницы, подвергнутых стрессовому воздействию).

Первоначально необходимо составить рабочую таблицу в любом из редакторов электронных таблиц (здесь приводится на примере MS Excel 2019,

построение графиков в LO Calc 7.6 показано в прошлых лабораторных работах), где в качестве переменной x выступает концентрации белка (мг/мл) в листьях пшеницы, а в качестве переменной y – оптическая плотность раствора (E_{750}).

На основе данных таблицы нужно построить точечную диаграмму с линиями, которые соединяют точки и отредактировать ее. Сравните полученный результат с рисунком 2.

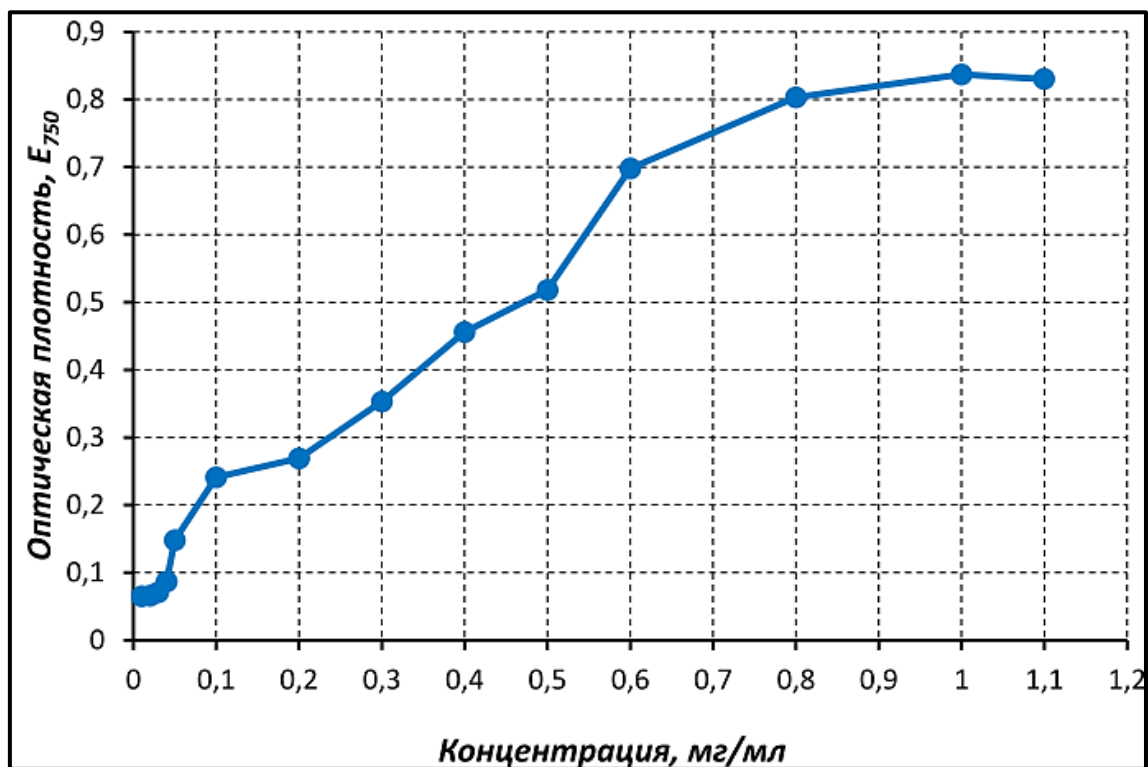


Рисунок 2 – S-образная кривая зависимости оптической плотности раствора от концентрации белка в листьях пшеницы

При рассмотрении графика можно отметить, что линейная зависимость наблюдается от значения концентрации 0,05 до 0,8 мг/мл.

Следовательно, все показатели, которые находятся до этого значения и после него можно отбросить как показатели погрешности прибора измерения и перестроить график зависимости используя этот новый диапазон данных и добавить на график линию тренда линейной функции и вывести ее формулу.

Для построения нового, отредактированного графика используйте большой масштаб (разместите его на отдельном листе), а на его осях отобразите промежуточные значения шкалы (с шагом 0,01). Полученный новый график сравните с рисунком 3.

Затем необходимо используя полученный график (рисунок 3) графически рассчитать содержание белка в опытных растворах, оптическая плотность которых была 0,54, 0,36 и 0,68.

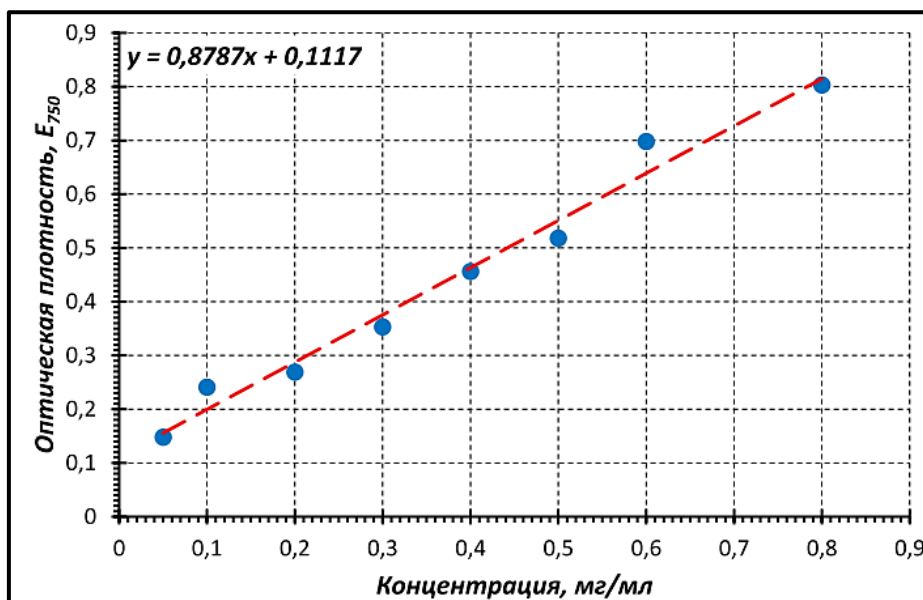


Рисунок 3 – Отредактированная кривая зависимости оптической плотности раствора от концентрации белка в листьях пшеницы

Для этого сначала по вертикальной оси отложите точку $E_{750} = 0,54$; соедините ее прямой линией, параллельной оси абсцисс с линией тренда, а в точке пересечения опустите перпендикуляр на горизонтальную ось и найдите значение концентрации белка в опытном растворе. Аналогично сделайте для значений 0,36 и 0,68. Проверьте полученный результат с рисунком 4.

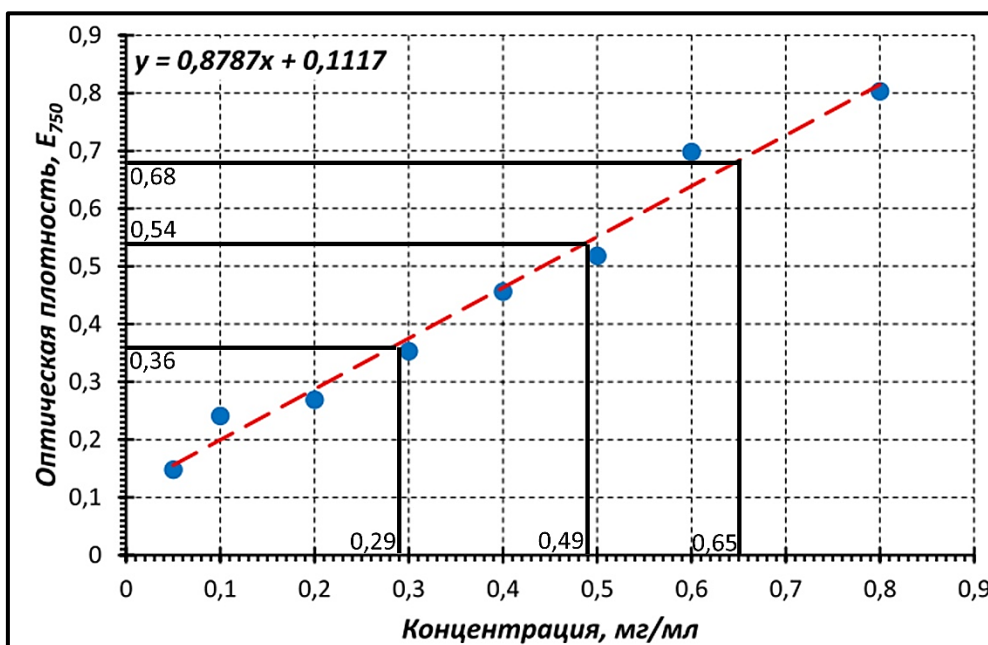


Рисунок 4 – Графическое определение концентрации белка по значениям оптической плотности раствора

Полученные данные занесите в таблицу:

Вариант опыта	Содержание белка, мг/мл, рассчитанное графически	Содержание белка, мг/мл, рассчитанное по формуле
Контроль		
Избыточное увлажнение		
Повышенная температура		

Затем, используя полученную формулу линейной зависимости:

$$y = 0,8787x + 0,1117$$

выразите из него величину x (концентрация белка) через постоянные коэффициенты и величину y (оптическая плотность раствора). Подставляя в полученную формулу представленные в задании значения оптической плотности (0,54, 0,36 и 0,68), рассчитайте соответствующие им значения концентрации с точностью до тысячной и занесите в таблицу. Сделайте вывод о точности этих двух видов линеаризации.

Выполните задания для самоконтроля 1 и 2.

2 Линеаризация экспоненциальной кривой

В природе, как мы видели в прошлых лабораторных работах, встречается большое количество процессов, которые описываются экспоненциальным уравнением $y = Ae^{bx}$. В математике основание экспоненциальной функции обозначается латинской буквой e (число Эйлера), которая приблизительно равно 2,718). Отсюда эту формулу можно переписать по другому: $y = Ae^{bx}$. Данная формула нам уже знакома и уже она встречалась в лабораторной работе по экспоненциальному росту популяции.

Существует множество других примеров использования этой зависимости в биологии, физике, экономике, медицине и других сферах человеческой деятельности (рисунок 5).

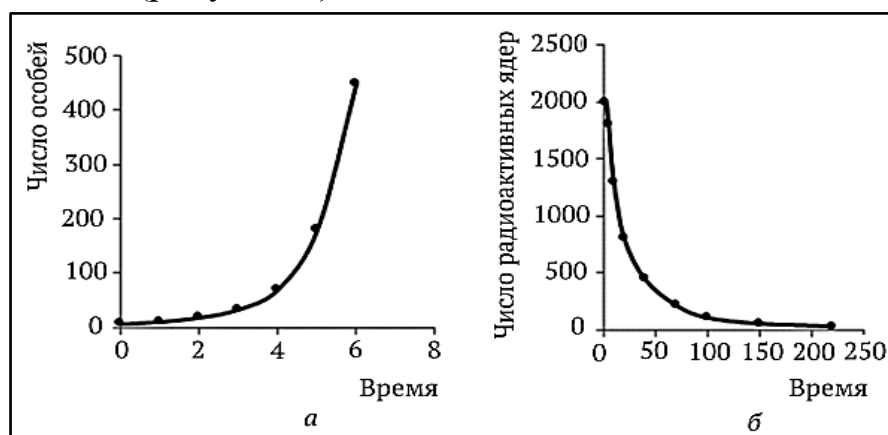


Рисунок 5 – Графики возрастающей и убывающей экспоненциальных зависимостей (а – отражающих увеличение числа особей; б – отражающих скорость распада радиоактивного элемента во времени)

Расчет численных параметров, описывающих данные процессы, производят путем преобразования нелинейной экспоненциальной зависимости в линейную функцию. Самый простой способ линеаризация экспоненциальной функции – логарифмирование.

Для этого нужно логарифмировать правую и левую части исходного экспоненциального уравнения:

$$\ln Y = \ln (A \exp(bx))$$

Далее необходимо раскрыть скобки, а исходя из определения, что логарифм произведения равен сумме логарифмов, а $\ln(\exp(bx)) = bx$, получается:

$$\ln Y = \ln A + bx$$

Зная коэффициент b в линейном уравнении, можно рассчитать период удвоения биомассы клеток $T_{1/2}$ (либо период полураспада или период полунгибирования, или период полувыведения в зависимости от исследуемого процесса).

Можно вывести формулу для расчета периода удвоения биомассы клеток ($T_{1/2}$).

Так как зависимость массы клеток от времени выражается функцией:

$$y = A \exp^{bx}$$

то отсюда $y(x+T_{1/2}) = 2y(x)$.

И после подстановки этого выражения в исходную функцию, получается следующее выражение:

$$A \exp^{b(x+T_{1/2})} = 2A \exp^{bx}$$

При перемножении двух чисел со степенями показатели степени складываются, следовательно, данное равенство можно записать в виде:

$$A \exp^{bx} \exp^{bT_{1/2}} = 2A \exp^{bx}$$

Затем необходимо упростить выражение, сократив одинаковые члены $A \exp^{bx}$ в правой и левой части равенства и получается, что $\exp^{bT_{1/2}} = 2$.

Для избавления от экспоненты нужно прологарифмировать обе части равенства. Согласно определению, логарифм от экспоненты равен ее показателю, т. е.

$$bT_{1/2} = \ln 2$$

Отсюда получается, что период удвоения биомассы клеток:

$$T_{1/2} = \frac{\ln 2}{b}$$

Задание 2. Были получены экспериментальные данные роста суспензионной культуры клеток моркови:

Время, сутки (x)	1	2	3	4	6	8	10	12
Плотность клеток, г/л (y)	9,1	11,5	17,4	25,0	44,0	80,0	145,0	244,0
$\pm y$	0,8	0,8	2,1	3,2	5,6	6,1	9,2	25,0

На основании приведенных данных опишите характер процесса роста суспензионной культуры клеток моркови и рассчитайте период удвоения биомассы.

Решение

При решении данной задачи ее необходимо разбить на 3 части: представить процесс роста суспензионной культуры клеток моркови на графике и затем линеаризовать его путем логарифмирования и построения линейной зависимости и добавить линию тренда с выводом ее уравнения, а на основании его – рассчитать значение $T_{1/2}$.

Для решения 1 части задачи необходимо составить рабочую таблицу в любом из редакторов электронных таблиц, где в качестве переменной x выступает время, а в качестве переменной y – плотность клеток. Затем, на ее основе построить точечный график этой зависимости, отформатировать его, добавить на график значения стандартных ошибок и соответствующей линии тренда. Сравните получившийся график с рисунком 6.

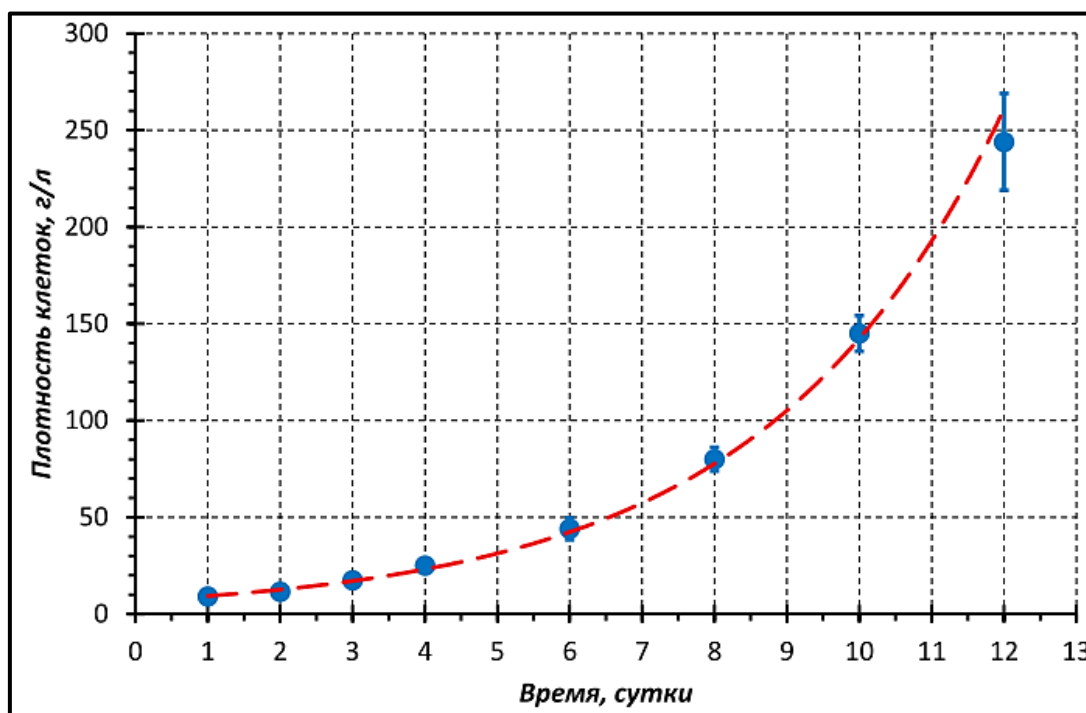


Рисунок 6 – График зависимости роста плотности клеток моркови от времени

Очевидно, что данная зависимость имеет экспоненциальный характер. Таким образом, получен ответ на первую часть задачи.

Для решения второй части задачи, т.е. линеаризации экспоненциальной кривой необходимо в рабочей таблице добавить ещё одну переменную – значение натурального логарифма плотности клеток ($\ln y$) и провести логарифмирование значений плотности (не ошибок!) для каждого значения времени. Затем нужно построить точечный график, похожий на предыдущий, только в качестве переменной y новая переменная $\ln y$. Сравните получившийся график с рисунком 7.

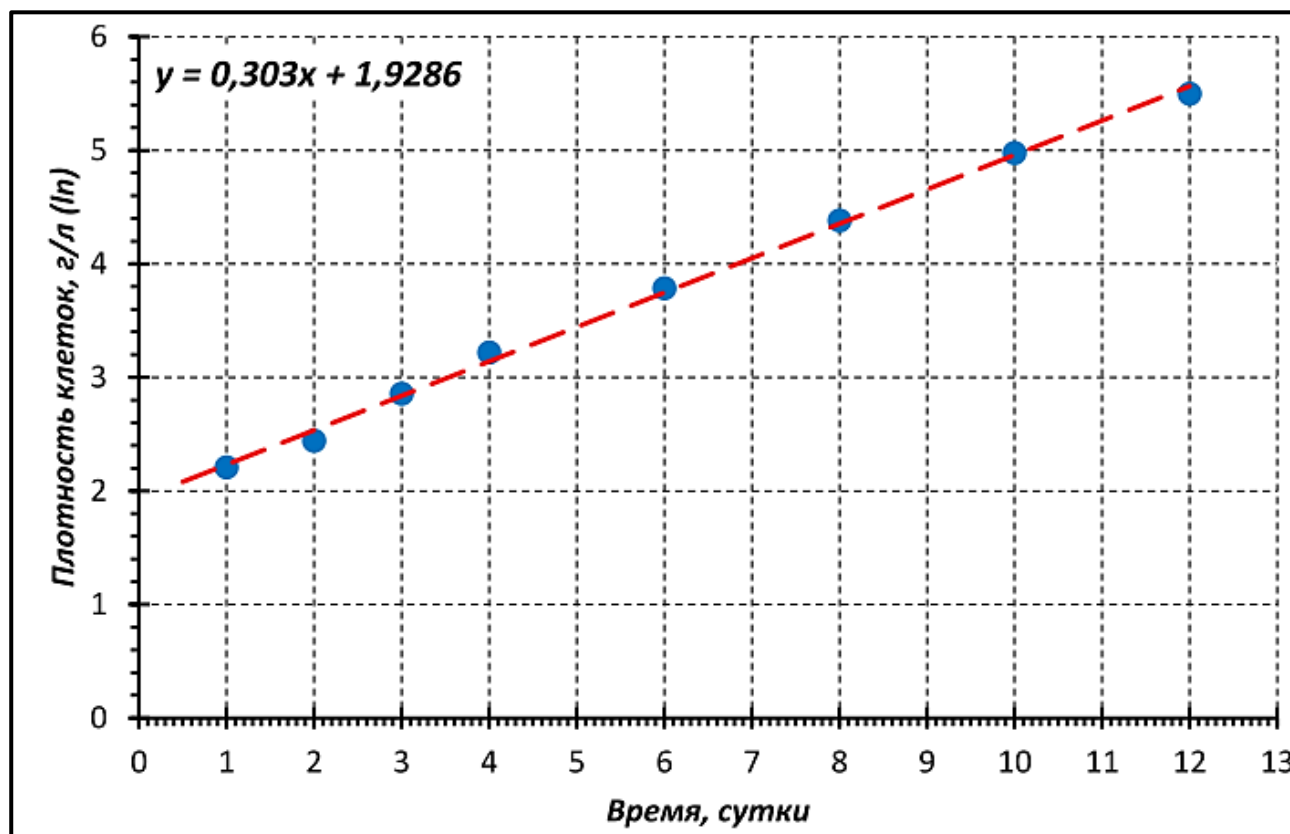


Рисунок 7 – График зависимости роста плотности клеток моркови от времени после линеаризации

Далее осталось найти время удвоения биомассы клеток моркови ($T_{1/2}$), используя формулу

$$T_{1/2} = \frac{\ln 2}{b}$$

где b – числовой коэффициент при x в полученном линейном уравнении.

Т.е. $T_{1/2} = \ln 2 / 0,303 = 0,36$. Другими словами, уже спустя 36 минут после начала культивирования количество клеток моркови стало вдвое больше помещенного в реактор.

Выполните задание для самоконтроля 3.

Задания для самоконтроля

1) Используя данные из задания 1 выясните, будут ли достоверны результаты при оптической плотности раствора 0,07; 0,09; 0,48; 0,825?

2) Используя данные из задания для самоконтроля 2 к лабораторной работе №7 по питанию мышевки лесной (*Sicista betulina*) в окрестностях скважин Южно-Осташковского нефтяного месторождения линеаризуйте кривую питания и определите среднее число личинок и куколок жуков–ксилофагов на 1 м² при среднем числе поедаемых их мышевкой 6,12; 10,2; 27,3; 30,3 и 60,1.

3) Изучали процесс ингибирования гербицидом атразином транспорта ионов аммония клетками водоросли *Nitella flexilis*. Атразин – гербицид симтриазинового ряда, оказывающий ингибирующее действие на транспорт ионов аммония через плазмалемму растительной клетки:

Экспериментальные данные динамики транспорта ионов аммония в клетки водоросли *Nitella flexilis* в присутствии атразина

Атразин, 10 мг/л						
Время, ч	0,1	0,3	0,5	1,0	1,5	3,0
Поток аммония, % к контролю	100±10	76±9	67±7	49±5	35±6	18±4
Атразин, 20 мг/л						
Время, ч	0,1	0,3	0,5	1,0	1,5	3,0
Поток аммония, % к контролю	95±8,5	54±4,3	23±3,1	10±2,8	6±1,7	4±1,2

Постройте точечные диаграммы, отражающие ингибирование поглощения ионов аммония клетками гербицидом в двух различных концентрациях. Проведите линеаризацию полученных зависимостей и рассчитайте период полуингибирования.