

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего образования
«СЕВАСТОПОЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

**ОЦЕНИВАНИЕ ПАРАМЕТРОВ СВЯЗЫВАНИЯ
ГЕТЕРОЦИКЛИЧЕСКИХ ЛИГАНДОВ
С ПОЛИМЕРНОЙ ДНК
ПО ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ ДАННЫМ
СПЕКТРОФОТОМЕТРИИ**

Учебно-методическое пособие
к курсовой работе по дисциплине
«Молекулярная спектроскопия»
для студентов направления подготовки
03.04.02 Физика очной формы обучения

Севастополь
СевГУ
2019

УДК 535.243(076)
ББК 22.344я73
О-931

Р е ц е н з е н т:

А.А. Ярошенко – доктор физико-математических наук, профессор,
заведующий кафедрой фундаментальных дисциплин филиала
ФГБОУ ВО «ГМУ им. адмирала Ф.Ф. Ушакова» в г. Севастополе

**О-931 Оценивание параметров связывания гетероциклических
лигандов с полимерной ДНК по экспериментальным данным
спектрофотометрии: учеб.-метод. пособие к курсовой работе по дис-
циплине «Молекулярная спектроскопия» для студентов направления
подготовки 03.04.02 Физика очной формы обучения / Сост. С.Ф. Ба-
рановский, Д.П. Воронин. – Севастополь: СевГУ, 2019. – 41 с.**

Учебно-методическое пособие разработано с целью выработки и закрепле-
ния у студентов практических навыков по выполнению задач прикладной спек-
троскопии: моделированию и обработке экспериментальных данных.

УДК 535.243(076)
ББК 22.344я73

Методические указания рассмотрены и утверждены на заседании
кафедры «Физика», протокол № 3 от 20 ноября 2018 г.

Допущено учебно-методическим центром СевГУ в качестве мето-
дических указаний.

СОДЕРЖАНИЕ

Введение	4
Часть 1. Содержание, структура и оформление работы	5
Часть 2. Общие сведения о спектрофотометрическом исследовании связывания гетероциклических лигандов с ДНК	7
Часть 3. Спектроскопия поглощения в видимой и ближней УФ-области	12
Часть 4. Обработка экспериментальных данных	18
Часть 5. Оценка ΔH , ΔS и ΔG комплексообразования молекул	35
Литература	37
Приложение А	39
Приложение Б	40

ВВЕДЕНИЕ

Дисциплина "Молекулярная спектроскопия" является одной из ведущих дисциплин, изучение которой предусмотрено учебным планом для студентов направления подготовки 03.04.02. В 9-м семестре очной формы обучения предусмотрено выполнение курсовой работы по данным спектрофотометрического эксперимента.

Выполнение курсовой работы способствует закреплению теоретических знаний и приобретению практических навыков в решении задач прикладной спектроскопии, в частности, оценивания термодинамических параметров связывания гетероциклических соединений с ДНК в водно-солевом растворе.

В данном пособии изложены общие требования к выполнению курсовой работы, правила оформления пояснительной записки, представлены методики расчетов параметров моделей, также приводится список рекомендуемой литературы для более глубокого изучения вопросов, связанных с выполнением курсовой работы.

1. СОДЕРЖАНИЕ, СТРУКТУРА И ОФОРМЛЕНИЕ РАБОТЫ

Начальный этап выполнения курсовой работы предполагает изучение теоретического материала курса «Молекулярная спектроскопия» по конспекту лекций с привлечением дополнительной литературы, рекомендованной в пособии. Этот этап заканчивается написанием реферата, в котором должны быть изложены способы связывания лигандов с макромолекулой, качественный и количественный спектрофотометрический анализ молекул в ассоциированном состоянии, вопросы оценивания параметров математических моделей по данным экспериментов.

Основная часть работы предполагает применение спектрофотометрического метода измерений комплексообразования молекул и оценку параметров моделей по экспериментальным концентрационным зависимостям оптической плотности нелинейным методом наименьших квадратов.

Оформленная курсовая работа содержит оглавление, введение, краткий обзор научно-методической литературы по рассматриваемой теме, аналитическую и исследовательскую части, заключение, библиографический список литературы и приложения. Правила оформления курсовой работы предполагают расположение заголовков структурных элементов работы в середине строки без точки в конце, названия печатаются заглавными буквами. Между заголовком и текстом выдерживается расстояние в 3-4 интервала. Руководитель определяет структуру и объем работы в соответствии с её видом, характером и содержанием.

Правила оформления определяют печать текста на одной стороне листа (бумага белая, формат А4), через полтора интервала, цвет шрифта – черный. Размер шрифта (кегель) – не менее 12, шрифт – Times New Roman.

Поля: правое – не менее 15 мм, верхнее и нижнее – не менее 20 мм, левое – не менее 30 мм.

Нумерация страниц курсовой работы - сквозная по всему тексту, номер страницы указывается в правой верхней части листа. Номер на титульном листе не ставится, но он включается в общую нумерацию.

Оглавление содержит введение, наименование всех глав, параграфов, пунктов, заключение, библиографический список использованных источников, приложений с указанием номеров страниц, с которых начинаются эти элементы работы.

Для выполнения рисунков используется любой векторный редактор, например, Microsoft Visio, расположение рисунков – сразу после текста, в котором они упоминаются впервые, или на следующей странице, в тексте на них даются ссылки. Нумерация рисунков сквозная, арабскими цифрами. Подпись к рисунку располагается под ним посередине строки. Слово «Рисунок» пишется полностью. В конце названия точка не ставится.

Правила для оформления таблиц аналогичны, нумерация выполняется арабскими цифрами, её помещают над таблицей справа, при этом слово «Таблица» пишется полностью, без точки в конце.

Формулы выполняются в редакторе Microsoft Equation, их следует выделять из текста в отдельную строку. Над и под каждой формулой или уравнением нужно оставить по свободной строке. Если нужны пояснения к символам и коэффициентам формулы, то они приводятся сразу под ней в той же последовательности, в которой следуют в формуле. Если на формулы есть ссылки, то они нумеруются, обычно нумерация сквозная. Номер проставляется арабскими цифрами в круглых скобках в крайнем правом положении на строке.

В «Списке использованных литературных источников» сведения об источниках нужно нумеровать арабскими цифрами, печатать с абзацного отступа. В списке указываются фамилии и инициалы авторов, название источника, место и год издания.

Приложения размещают в конце работы и обозначают заглавными буквами русского алфавита, начиная с А После слова «Приложение» следует буква, обозначающая его последовательность (например: ПРИЛОЖЕНИЕ Б).

Титульный лист работы оформляют в соответствии с представленным в «Приложении А» образцом.

2. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ О СПЕКТРОФОТОМЕТРИЧЕСКОМ ИССЛЕДОВАНИИ СВЯЗЫВАНИЯ ГЕТЕРОЦИКЛИЧЕСКИХ ЛИГАНДОВ С ДНК

2.1 Введение. Хранение и передача наследственной информации в живых организмах осуществляется с помощью макромолекул ДНК.

Структура макромолекулы ДНК обуславливает её взаимодействия с биологически активными соединениями, среди которых можно выделить гетероциклические соединения. Первичная структура макромолекулы представляет собой последовательность нуклеотидов, соединенных фосфодиэфирными связями. Каждый нуклеотид состоит из гетероциклического основания (пуринового или пиримидинового), остатка дезоксирибозы и фосфатной группы. Согласно модели вторичной структуры, предложенной Уотсоном и Криком, молекула ДНК состоит из двух антипараллельных полинуклеотидных цепей, связанных водородными связями, возникающими между основаниями этих цепей. Аденин связывается с тиминном двумя водородными связями, а гуанин с цитозином – тремя. Внутри спирали основания образуют «стопки», их плоскости почти перпендикулярны оси. Результаты рентгеноструктурного анализа показывают, что могут существовать различные виды двойных спиралей, которые отличаются геометрическими параметрами. Наиболее часто встречается в природе ДНК В-формы. Диаметр спирали - 2 нм, высота витка вдоль оси спирали – 3,6 нм (на один виток приходится 10 пар оснований). На поверхности В-формы спирали образуются две бороздки: большая - шириной ~ 2,2 нм, и малая – 1,2 нм, глубина обеих канавок – 0,7 нм.

Структура ДНК довольно жесткая, но, несмотря на это, она обладает конформационной подвижностью. В результате теплового движения, под действием внешних условий и при взаимодействии с различными соединениями (лигандами) могут происходить локальные изменения параметров двойной спирали (изломы, изгибы, раскручивание, расхождение пар оснований). В связи с этим, способы взаимодействия лигандов с макромолекулой могут быть различны: бороздочное связывание, интеркаляция, электростатические взаимодействия с фосфатными группами на поверхности двойной спирали. В зависимости от способа связывания, многие лиганды могут нарушать функции макромолекулы.

Известно, что некоторые лиганды, обладая плоским гетероциклическим хромофором, способны встраиваться между парами оснований двойной спирали ДНК. Однако не существует однозначных выводов о зависимости способа связывания гетероциклических лигандов с ДНК от химической структуры лиганда.

Изучение ДНК– лиганд взаимодействий требует использования высокочувствительных спектральных приборов и обработки данных измерений,

базирующейся на методах решения соответствующих обратных задач. Такой подход может основываться с одной стороны на законах Бугера – Ламберта – Бера и аддитивности поглощения света, а с другой - на уравнениях теории химических равновесий, позволяющих связать общие концентрации в растворе веществ с их равновесными концентрациями в различных молекулярных формах (ассоциатах, мономерах) и равновесными константами связывания. Обычно определяются следующие параметры связывания биологически активных соединений с ДНК: константа ассоциации K , свободная энергия Гиббса $\Delta G = -RT \ln K$, энтальпия и энтропия ΔS комплексообразования молекул.

В ходе обработки результатов спектрофотометрических измерений комплексообразование молекул описывают моделями Скэтчарда, МакГи - фон Хиппеля и др. Параметры математических моделей оценивают по экспериментальным концентрационным зависимостям оптической плотности нелинейным методом наименьших квадратов.

2.2. Интеркаляционное связывание. В 1961 году Лерман, основываясь на гидродинамических и спектральных исследованиях взаимодействия акридиновых красителей с ДНК, предположил, что плоские гетероциклические молекулы способны связываться с ДНК путем интеркаляции. Согласно модели Лермана (классическая интеркаляция), при связывании красителя с биополимером плоскость хромофора лиганда располагается перпендикулярно оси двойной спирали между парами оснований ДНК. При этом происходит изменение геометрии сахарофосфатного остова и нарушение регулярности спиральной структуры ДНК (рис. 1).

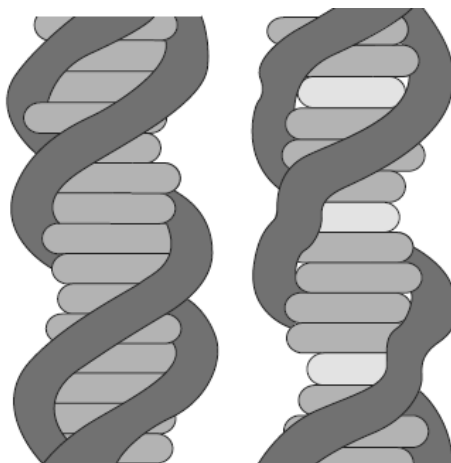


Рисунок 1 - Интеркаляция бромистого этидия в спираль ДНК. Регулярный ход двойной спирали (слева) в результате интеркаляции нарушается (справа)

Интеркалирующие соединения, как правило, имеют плоский гетероциклический хромофор, состоящий из трех сопряженных шестичленных колец. К этим соединениям относятся молекулы акридиновых, фенантридиновых красителей и др.

При встраивании молекул красителя между парами азотистых оснований ДНК, помимо изменений в структуре биополимера, возникают изменения в спектральных свойствах самих интеркалирующих соединений. Наличие плоского гетероциклического хромофора определяет существование у красителей длинноволновой полосы поглощения в видимой области спектра, соответствующей $\pi - \pi$ электронным переходам. При интеркаляции наблюдаются гипохромный эффект и батохромный сдвиг этой полосы. Подобные изменения в спектрах поглощения красителей происходят в результате изменения окружения молекулы лиганда при ее интеркаляции в ДНК.

Взаимодействие бромистого этидия (ЭБ) с ДНК. Взаимодействие молекул красителя с ДНК регистрируют по изменениям спектров поглощения лиганда, вызванным добавлением к раствору лиганда биополимера. При этом увеличение концентрации биополимера приводит к смещению максимума поглощения ЭБ относительно полос мономерных молекул (480 нм) в длинноволновую область спектра с одновременным изменением интенсивности поглощения и появлению изобестической точки (509 нм). Такие изменения спектров поглощения лигандов свидетельствуют об образовании ими комплексов с ДНК.

Механизм взаимодействия этидий бромид с ДНК описывается в рамках интеркаляционной модели. Интеркаляция ЭБ в ДНК сопровождается изменениями геометрии двойной спирали. Увеличение расстояния между парами азотистых оснований в месте интеркаляции лиганда вызывает изменение угла между этими парами оснований, приводящее к локальному раскручиванию двойной спирали. В В-форме ДНК угол поворота между соседними парами азотистых оснований равен 36° . При встраивании между ними фенантридинового красителя он увеличивается приблизительно на 25° . Такие изменения конформации ДНК могут приводить к тому, что соседние места рядом с интеркалированным этидием вдоль оси двойной спирали ДНК остаются свободными из-за нарушения геометрии нуклеотидов, примыкающих к интеркалятору.

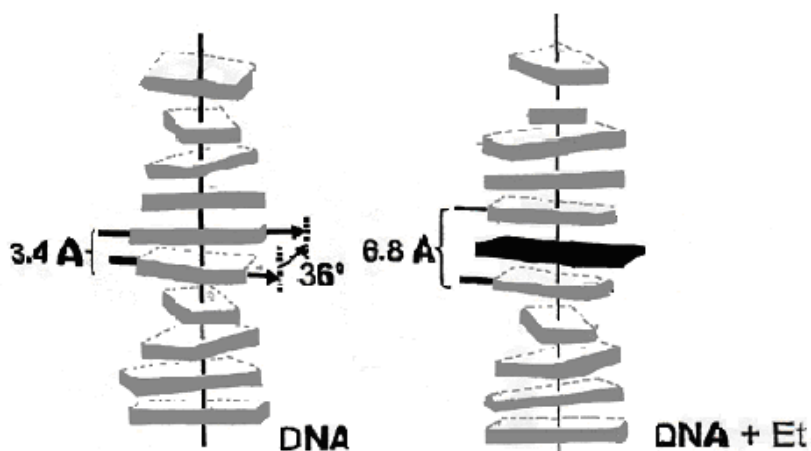


Рисунок 2 - Схема раскручивания двойной спирали и раздвигания пар оснований ДНК, вызываемых интеркаляцией этидия

2.3. Бороздочное связывание. Помимо интеркаляции, некоторые гетероциклические лиганды при специально подобранных условиях эксперимента (растворителя) демонстрируют неинтеркаляционный тип комплексобразования, чаще всего интерпретируемый как результат связывания лиганда с малой или большой бороздками полимерной цепи. Несмотря на то, что большая бороздка содержит больше возможностей для таких взаимодействий, почти все низкомолекулярные соединения, образующие с ДНК комплексы неинтеркаляционного типа, размещаются в малой бороздке. Это в значительной степени связано с соответствием ширины малой бороздки и размеров этих лигандов, и, тем самым, со стабилизацией этих комплексов нековалентными связями. Лиганды, связывающиеся в малой бороздке, не вызывают существенных структурных изменений в молекуле ДНК. Классическими представителями такого типа связывания являются нетропсин и дистамицин.

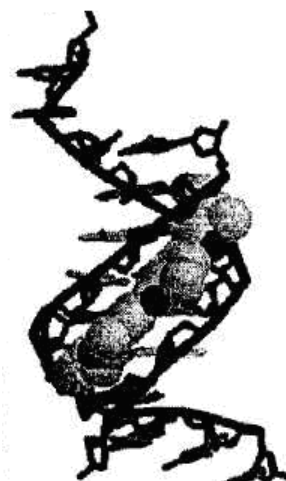


Рисунок 3 - Размещение в малой бороздке ДНК молекулы дистамицина

Экспериментальное разделение рассмотренных двух типов связывания, как правило, затруднительно, поскольку спектроскопические данные интеркаляционного и неинтеркаляционного связывания не всегда могут быть однозначно идентифицированы, так как они приводят к одинаковым изменениям спектра - длинноволновому смещению и падению интенсивности полос поглощения. Величина смещения зависит от типа лиганда, вида полимера и условий эксперимента.

2.4. Внешнее связывание. Третьим возможным способом связывания молекул с ДНК является образование внешнего комплекса, при котором некоторые лиганды способны связываться с фосфатными группами ДНК. Такое связывание имеет электростатическую природу, и константы связывания принимают более низкие значения по сравнению с интеркаляционным и бороздочным связыванием. Такой тип взаимодействия обычно возникает у положительно заряженных лигандов. В отличие от рассмотренных двух типов связывания, внешнее связывание носит преимущественно

энтропийный характер. Это объясняется тем, что при образовании комплекса ДНК с положительно заряженным лигандом происходит высвобождение с поверхности биополимера ранее связанных с ней противоионов. В спектрах поглощения лигандов, связывающихся с поверхностью биополимера, наблюдается гипохромный эффект.

2.5. Комбинированные взаимодействия. Результаты исследований взаимодействия ДНК с большим количеством соединений, обладающих разнообразной структурой, привели к появлению различных модификаций используемых моделей связывания. Например, некоторые антрациклиновые антибиотики связываются с ДНК таким образом, что аминокислотный заместитель агликона оказывается в малой бороздке, а кольцо с метоксигруппой – в большой (рис. 4).

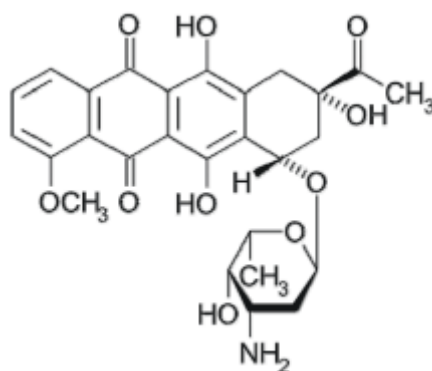


Рисунок 4 - Структура дауномицина

В некоторых случаях наличие у соединения громоздкого заместителя, препятствующего встраиванию между парами оснований ДНК, может приводить к возникновению частичной интеркаляции. Такое связывание наблюдается при взаимодействии ДНК с антибиотиком актиномицином D. Из сказанного следует, что соединения, имеющие плоский гетероциклический хромофор, могут взаимодействовать с ДНК, образуя комплексы различной структуры, которые можно исследовать методом спектрофотометрии.

3. СПЕКТРОСКОПИЯ ПОГЛОЩЕНИЯ В ВИДИМОЙ И БЛИЖНЕЙ УФ-ОБЛАСТИ

Распространенным методом исследования взаимодействия лигандов с биополимерами является спектроскопия поглощения в УФ и видимой области спектра. Изучение комплексообразования лигандов с ДНК может осуществляться наблюдением за изменениями в спектрах поглощения. Многие молекулы, используемые в качестве гетероциклических лигандов, имеют полосы поглощения в видимой области, то есть перекрывающиеся с полосой поглощения биополимера. Способом определения наличия взаимодействия между ДНК и лигандами является наблюдение за изменением положения максимума поглощения свободного лиганда и связанного с макромолекулой. По величине смещения максимума в длинноволновой области можно оценить силу взаимодействия молекул.

Образование комплекса лиганда с ДНК приводит к изменениям в спектрах поглощения лиганда. Это взаимодействие чаще всего связано с обратимым процессом, поэтому определение константы связывания помогает понять природу данного процесса. Анализ изменения спектров также дает представление о размере места связывания.

В работе метод спектрофотометрии используется для получения равновесных параметров взаимодействия лиганда с ДНК.

В схеме комплексообразования предполагается, что молекулы красителя, связанные с ДНК, находятся в равновесии со свободными лигандами и свободными участками (местами связывания) биополимера. Предполагается также, что все места связывания на полимере идентичны и независимы. При связывании лиганд занимает n пар оснований, которые становятся недоступными для связывания с другими молекулами красителя. Равновесие в растворе моделируется схемой:



где K – равновесная константа связывания лиганда с парами оснований; P – свободные участки биополимера, содержащие n пар оснований; L_1 – мономеры лигандов; PL_1 – комплекс лиганда с участком биополимера. Выражение равновесной константы комплексообразования

$$K = \frac{[PL_1]}{[P] \cdot [L_1]} \quad (2)$$

представим в виде

$$K = \frac{[L_2]}{\left(\frac{[P_0]}{n} - [L_2]\right) \cdot [L_1]} \quad (3)$$

Здесь $[L_2]$ – концентрация участков полимера, занятых лигандами ($[L_2] = [PL_1]$), $[P_0]$ – исходная концентрация пар оснований ДНК, $[P_0]/n - [L_2]$ – концентрация свободных участков ($[P_0]/n - [L_2] = [P]$). Согласно схеме (1), наблюдаемую оптическую плотность лиганда в растворе можно описать выражением:

$$A = \varepsilon_1 l [L_1] + \varepsilon_2 l [L_2], \quad (4)$$

где l – длина оптического пути; $\varepsilon_1, \varepsilon_2$ – коэффициенты молярного поглощения лиганда в свободном и связанном состояниях соответственно.

Исключив из формулы (4) концентрацию $[L_1]$ с помощью закона сохранения массы

$$[L_0] = [L_1] + [L_2], \quad (5)$$

получим

$$A = A_0 - \Delta\varepsilon l [L_2], \quad (6)$$

где $\Delta\varepsilon = \varepsilon_1 - \varepsilon_2$; $A_0 = \varepsilon_1 l [L_0]$ – оптическая плотность разбавленного раствора красителя в мономерной форме. Выражение для концентрации $[L_2]$, полученное из законов сохранения массы (5) и действующих масс (3), имеет вид:

$$[L_2] = \frac{1}{2} \left(\frac{1}{K} + [L_0] + \frac{[P_0]}{n} \right) - \sqrt{\frac{1}{4} \cdot \left(\frac{1}{K} + [L_0] + \frac{[P_0]}{n} \right)^2 - \frac{[P_0] \cdot [L_0]}{n}}, \quad (7)$$

Выражение (6), описывающее наблюдаемую оптическую плотность раствора, содержит три неизвестных параметра K , n и $\Delta\varepsilon$, для расчета которых используются экспериментальные зависимости поглощения красителя в системе лиганд - ДНК (Приложение Б, таблицы). Параметры модели можно определить путем минимизации функционала:

$$S = \sum_{i=1}^n (A_i^\delta - \hat{A}_i)^2, \quad (8)$$

где A_i^δ – экспериментальные значения оптической плотности, измеренные с погрешностью δ ; A_i – значения оптической плотности, рассчитанные с помощью выражения (6).

Модель Скэтчарда широко применима, но при обработке экспериментальных данных могут быть значительные неточности, т.к. влияют статистические эффекты, возникающие в том случае, когда лиганд занимает несколько мест связывания, или когда связанные лиганды взаимодействуют (антикооперативное и кооперативное взаимодействие). В этом случае более объективный анализ экспериментальных данных можно провести с использованием модели МакГи и фон Хиппеля.

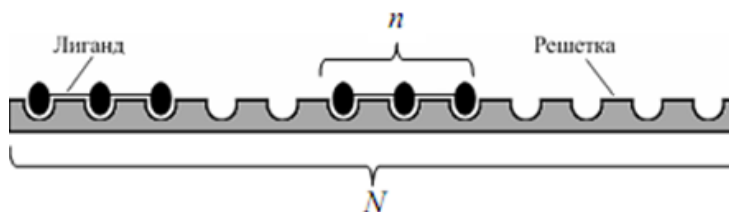


Рисунок 5 - Схематическое изображение связывания лиганда с ДНК

Согласно модели МакГи и фон Хиппеля, молекула ДНК представляет собой жесткий полимер (решетку), состоящий из N повторяющихся звеньев (рис. 5). Лиганд может занять любые n последовательных звеньев (пар оснований) решетки, поэтому у первого связывающегося лиганда на полностью свободной решетке имеется $N - n + 1$ потенциальных мест посадки. Число потенциальных мест связывания много больше, чем число участков N/n , которые могут быть заняты при насыщении полимера.

В одних случаях лиганды располагаются таким образом, что решетка не может связать ни одного дополнительного лиганда при наличии свободных центров, а в других – остаются места для присоединения лигандов. Все эти формы находятся в равновесии со свободными лигандами.

Обозначив среднее число свободных участков связывания, расположенных на одной линейной макромолекуле, символом N_f , равновесную константу комплексообразования запишем в виде

$$K = \frac{[PL_1]}{N_f [P_{ii}] [L_1]}, \quad (9)$$

где $[P_{ii}]$ - концентрация макромолекул.

При описании адсорбции лигандов на решетке главная задача состоит в определении величины:

$$N_f = (N - n + 1)P_n, \quad (10)$$

где P_n - вероятность того, что n последовательно расположенных элементов (пар оснований) решетки, начиная с любого положения на ней, не за-

няты лигандом (вероятность обнаружения на решетке незанятого участка), $(N - n + 1)$ - максимальное количество потенциальных участков связывания на свободном полимере.

При $N \gg n$, выражение (10) можно записать так:

$$N_f = N \cdot P_n. \quad (11)$$

Вероятность P_n , умноженная на общее число пар оснований полимера N , дает среднее число свободных лиганд - связывающих участков N_f длиной n на одной решетке.

В терминах условных вероятностей P_n можно представить в виде [10,11]:

$$P_n = P_f P_{ff}^{n-1}, \quad (12)$$

где P_f - вероятность того, что произвольно выбранный элемент (пара оснований) решетки не занят лигандом, P_{ff} - условная вероятность того, что за данным свободным элементом решетки следует другой незанятый элемент (P_{ff}^{n-1} - условная вероятность события наступающего или повторяющегося $n - 1$ раз).

Используя долю занятых элементов решетки P_b , или вероятность того, что данный центр решетки занят, выразим P_f :

$$P_f = 1 - P_b = 1 - \frac{n[L_2]}{N[P_{ff}]} = 1 - \frac{n}{N} \frac{[L_2]}{[P_{ff}]} = 1 - \frac{nv}{N}. \quad (13)$$

Условная вероятность P_{ff} представляет собой также долю свободных элементов решетки, находящихся перед незанятыми элементами. Эта величина равна разности между общим числом свободных элементов решетки и числом свободных элементов, стоящих перед занятым, деленной на общее число свободных элементов решетки [10,11]:

$$P_{ff} = (P_f - P_{bn}P_{bf}) / P_f, \quad (14)$$

где P_{bf} - условная вероятность того, что перед крайней (n -й) частью связанного лиганда расположен свободный элемент решетки; $P_{bn} = \frac{[L_2]}{[P_{MM}]N} = \frac{P_b}{n}$ - условная вероятность того, что элемент за свободной парой оснований

полимера занят крайней (n-й) частью связанного лиганда. Если предположить, что адсорбция лигандов не деформирует структуру полимера, а связанные лиганды не взаимодействуют между собой, то $P_{ff} = P_{bf}$. Используя это соотношение, уравнение (14) можно преобразовать к следующему виду:

$$P_{ff} = \frac{P_f}{P_f + P_{bn}} = \frac{N - nv}{N - (n-1)v} = \frac{N - nv}{N - (n-1)v} . \quad (15)$$

С учетом уравнений (12) и (15), среднее число свободных участков, содержащих n пар оснований, представим следующим образом:

$$N_f = NP_n = N(1 - nv/N) \left(\frac{1 - nv/N}{1 - (n-1)v/N} \right)^{n-1} . \quad (16)$$

Используя ранее введенные обозначения, получим

$$N_f = N(1 - n[L_2]/[P_{mm}]N) \left(\frac{1 - n[L_2]/[P_{mm}]N}{1 - (n-1)[L_2]/[P_{mm}]N} \right)^{n-1} . \quad (17)$$

Перепишем (17), положив $[P_{mm}]N = [P_0]$:

$$N_f = N(1 - n[L_2]/[P_0]) \left(\frac{1 - n[L_2]/[P_0]}{1 - (n-1)[L_2]/[P_0]} \right)^{n-1} . \quad (18)$$

Подставляя (18) в уравнение (9) получим

$$\frac{[L_2]}{[P_0]([L_0] - [L_2])} = K \left(1 - \frac{n \cdot [L_2]}{[P_0]} \right) \left[\frac{[P_0] - n \cdot [L_2]}{[P_0] - (n-1) \cdot [L_2]} \right]^{n-1} . \quad (19)$$

При выводе этого уравнения (МакГи – фон Хиппеля) не учитывались концевые эффекты, поэтому, строго говоря, оно справедливо только для решетки (полимера), состоящей из бесконечно большого числа элементов. Вместе с тем, уравнение (19) позволяет достаточно точно описать многие экспериментальные системы, включая решетки, состоящие из ограниченного числа элементов.

Выражение (19) можно сравнить с уравнением (7, модель Скетчарда), полученным для систем, в которых отсутствует эффект “перекрывания” участков связывания. Эффект “перекрывания” обусловлен тем, что при насыщении решетки лигандами их распределение по решетке делает часть центров недоступными для связывания каждой следующей молекулы кра-

4. ОБРАБОТКА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ДАННЫХ

При проведении экспериментов возможны две ситуации. В первом случае для исследуемого процесса или явления нет теоретического описания, нет математической модели, и ставится задача накопления экспериментального материала с тем, чтобы в последующем дать теоретическое описание. Во втором случае эксперимент проводится в условиях, когда есть теоретическое описание исследуемого объекта, структура математической модели определена и эксперимент направлен на то, чтобы конкретизировать математическую модель, например, определить параметры модели.

Математически процесс измерения можно описать операторным уравнением:

$$\hat{K}u = f^{\delta} \quad (1)$$

и схематически проиллюстрировать так:



где u – совокупность измеряемых характеристик вещества, K – измерительный прибор, который формирует выходной сигнал f^{δ} , измеренный с погрешностью δ . В уравнении (1) u и f^{δ} это некоторые переменные, а $\hat{K}$ – оператор, устанавливающий причинно – следственную связь между u и f^{δ} , действуя из пространства элементов U в пространство измеряемых величин f^{δ} .

С точки зрения соотношения причина – следствие, задачи, возникающие при измерениях, можно условно разделить на два класса: прямые задачи (известны причины, необходимо найти следствия) и обратные (известны следствия, нужно найти причины). Например, если заданы положения и величины зарядов нескольких точечных тел, то мы можем вычислить по формулам электростатики напряженность электрического поля в любой точке пространства. Это прямая задача, её решение предопределяется моделью и заданием входных данных. К прямым задачам относится экспериментальная задача измерения спектров поглощения исследуемых молекул.

К обратной задаче относится, например, задача определения местоположения зарядов по их величине и напряженности электрического поля, измеренной в произвольных точках пространства. При решении такой задачи необходимо выбрать модель поля, а затем определить местоположе-

ние зарядов. Если обратиться к уравнению (1), то обратная задача состоит в определении характеристик объекта по результатам измерений f^δ .

В спектроскопии любой метод служит для получения данных о тех или иных свойствах вещества (или данных о параметрах модели). Последовательность измерений и вычислений при этом такова, что связь между причиной и следствием оказывается обращенной. "Причинами" являются характеристики вещества (или параметры модели), а "следствием" – спектры поглощения и т.п. Оценка характеристик среды или параметров модели по данным эксперимента – обратная задача.

Под обратными задачами, в общем случае, понимают задачи, решение которых проводится в рамках некоторой математической модели исследуемого объекта или процесса и заключается в определении параметров данной модели по имеющимся результатам наблюдений и другой экспериментальной информации.

В отличие от прямой задачи, Решение обратной задачи считается более трудоёмким по сравнению с решением прямой задачи, так как один и тот же эффект (следствие) может быть порожден разными причинами. Если для решения прямой задачи достаточно знать одну причинно-следственную связь, то для решения обратной задачи необходимо учитывать многие причинно – следственные связи.

Обратные задачи обладают рядом особенностей. Они, как правило, нелинейные, то есть неизвестная функция или неизвестные параметры входят в операторное или функциональное уравнения нелинейно. В случае спектрофотометрического анализа нелинейной функцией параметров комплексобразования является оптическая плотность или молярный показатель поглощения. При этом для обеспечения единственности решения необходимо иметь как можно больше различной экспериментальной информации об изучаемом процессе. Обратные задачи не являются корректными.

Понятие корректной задачи, сформулированное Ж. Адамаром (1923 г.), означает, что решение задачи существует, единственно и непрерывно определяется входными данными. Смысл этого условия состоит в том, что данные наблюдений не противоречат друг другу и их достаточно для однозначного решения задачи. Непрерывная зависимость решения от исходных данных означает, что малые изменения в них приводят к малым изменениям в решении, т.е. решение устойчиво по отношению к малым возмущениям (ошибкам) данных наблюдений. Если какое-либо из этих условий не выполняется, то задача является некорректно поставленной.

Наиболее часто нарушается условие устойчивости решения. В спектроскопии это нарушение связано с сильным влиянием погрешностей экспериментальных данных на искомое решение (необходимо измерять концентрации и оптические плотности с наибольшей возможной точностью). Решение обратной задачи с "испорченными" входными данными может

сильно отличаться от точного решения. В результате Адамар пришел к заключению, что задачи, решения которых испытывают большие изменения при малых возмущениях данных наблюдений, не имеют практического смысла.

Какой же смысл имеет задача, в которой малым возмущениям входной информации (ошибкам наблюдений) могут соответствовать большие изменения или возмущения решения? Парадокс заключается в том, что значительная, если не основная, часть задач интерпретации данных физических экспериментов приводит к обратным задачам, подавляющее большинство которых некорректно поставлены.

Для того, чтобы экспериментальные данные обеспечивали однозначный результат, говорят о постановке полной обратной задачи: о более совершенной математической модели. Однако задача может оказаться неполной (модель не описывает все стороны изучаемого процесса), что приводит к множеству решений и требует от исследователя дополнительных данных для выбора одного из них. Важно подчеркнуть, что эта дополнительная информация об искомом решении должна быть известна а priori, до решения некорректной задачи.

Априорная информация позволяет сформулировать критерии отбора решения из множества приближенных решений уравнения (1). Такой информацией могут служить сведения о монотонности убывания (возрастания) искомого решения, его ограниченности, неотрицательности и т.п. Учет дополнительных сведений о свойствах исследуемого объекта или процесса приводит к сужению класса возможных решений и, как правило, к снижению погрешности определения нужных характеристик.

Большой вклад в развитие математической теории некорректных задач внес А.Н. Тихонов [12], он предложил сводить исходную задачу решения операторного уравнения к проблеме отыскания минимума некоторого функционала.

На практике к решению обратной задачи физического эксперимента есть два подхода. Один из них состоит в создании алгоритма решения задачи в рамках некоторой заданной математической модели $f(\xi, \theta)$, где ξ - контролируемые переменные, θ - параметры модели ("причины" конкретизируются в виде параметров θ). Примером является модель Скэтчарда:

$$f(\xi, \theta) = A_0 - \frac{\Delta \varepsilon \ell}{2} \left(\frac{1}{K} + [L_0] + \frac{[P_0]}{n} - \sqrt{\left(\frac{1}{K} + [L_0] + \frac{[P_0]}{n} \right)^2 - \frac{4[P_0][L_0]}{n}} \right), \quad (2)$$

где $\Delta \varepsilon = \varepsilon_1 - \varepsilon_2$; $A_0 = \varepsilon_1 \ell [L_0]$ - оптическая плотность разбавленного раствора красителя в мономерной форме. Поиск параметров $\theta(\Delta \varepsilon, n, K)$ проводится по схеме: строится математическая модель на множествах измеряемых величин $\xi([P_0], [L_0])$ и f^δ , задаются начальные значения θ_0 , и вычисляется

сумма разностей квадратов отклонений экспериментальных f^δ и расчетных величин $f(\xi_u, \theta)$ (или сумма квадратов невязок):

$$S = \sum_{u=1}^n [f_u^\delta - f(\xi_u, \theta)]^2. \quad (3)$$

С помощью многократного решения прямой задачи (многократных расчетов оптической плотности по формуле $f(\xi, \theta)$), варьируя параметры на множестве Θ допустимых значений ($\theta \in \Theta$), например, итерационным методом, производится сближение модели $f(\xi, \theta)$ с экспериментальными данными, или минимизация суммы (3). Параметры модели θ определяют из условия наилучшего совпадения экспериментальных и расчетных данных.

Метод подбора позволяет получить решение, если множество искомым моделей компактно в R^n (R^n - n -мерное метрическое пространство): при стремлении невязки к нулю $f(\xi, \theta)$ стремится к точному решению $f_0(\xi, \theta)$. Другими словами, если уменьшать δ , то решение, получаемое методом подбора на некотором множестве моделей, будет стремиться к точному решению лишь тогда, когда это множество компактно в R^n . Напомним, множество моделей называется компактным в R^n , если из всякой последовательности его элементов можно выделить подпоследовательность, сходящуюся к некоторому элементу того же множества. Множество моделей компактно в R^n тогда и только тогда, когда оно замкнуто и ограничено, то есть когда все параметры модели изменяются в конечных пределах.

Недостатком данного метода решения обратной задачи является обязательная привязка к некоторой модели, задание которой, вообще говоря, требует наличия достаточно подробной информации о процессе (объекте). Может возникнуть вопрос об однозначности соответствия найденной модели результатам эксперимента. Существует опасность использовать модель с излишним числом параметров, не коррелирующей с результатами измерений.

Второй подход состоит в непосредственном решении обратной задачи, исходя из уравнения (1) и экспериментальных данных (без использования модели типа $f(\xi, \theta)$). Оба подхода применяются для анализа результатов физического эксперимента.

Вообще говоря, использование функционала (3) дает хороший результат лишь тогда, когда число определяемых параметров небольшое. Когда число искомым параметров велико, и модель становится достаточно "гибкой", т.е. описывает не только ту часть оптической плотности, которая представляет интерес, но помеху и погрешность исходных данных, то получаются неустойчивые и нереальные результаты. При этом

точность описания экспериментальных данных достигается за счет сильного искажения модели в ходе минимизации функционала (3).

Одним из путей решения этих проблем может быть метод, предложенный академиком А.Н. Тихоновым, – метод регуляризации [19], то есть использование функционала, представляющего собой сумму квадратов невязок и регуляризующего члена (стабилизатора функционала):

$$S = \sum_{u=1}^n [f_u^\delta - f(\xi_u, \theta)]^2 + \alpha \Omega(\theta). \quad (4)$$

Вид регуляризующего члена $\Omega(\theta)$ далеко не однозначен и его выбор, как правило, продиктован физическим содержанием рассматриваемой задачи.

Если процесс (объект) описывается моделью с параметрами $\theta_1 \dots \theta_m$, а также известно, что решение должно быть похоже на процесс (объект) с параметрами $\theta_1^0 \dots \theta_m^0$, то в качестве стабилизатора может быть взят функционал:

$$\alpha \Omega(\theta) = \alpha \sum_{k=1}^m (\theta_k - \theta_k^0)^2. \quad (5)$$

Регуляризующий член содержит в себе информацию (числовые значения $\theta_1^0 \dots \theta_m^0$) о величине искомых параметров и коэффициент регуляризации α . Регуляризующее звено делает функционал (4) более выпуклым – с выраженным минимумом, позволяющим более точно определить параметры модели. Выбор регуляризующего решения осуществляется при условии, что невязка не превышает заданную величину δ и

$$\alpha \Omega(\theta) = \min. \quad (6)$$

Таким образом, мы приходим к задаче о минимизации функционала

$$\sum_{u=1}^n [f_u^\delta - f(\xi_u, \theta)]^2 + \alpha \sum_k (\theta_k - \theta_{k0})^2 = \min, \quad (7)$$

решаемой при каждом значении коэффициента α и согласовании его с δ по невязке

$$\sum_{i=1}^n [f_i^\delta - f(\xi_i, \theta)]^2 \leq n\delta^2. \quad (8)$$

Выбор регуляризованного решения $\theta_1 \dots \theta_m$ осуществляется по критерию невязки (8). Это значит, что перебирая различные значения коэффициента регуляризации α , необходимо следить за получаемой невязкой и выбирать такие решения $\theta_1 \dots \theta_m$, которые удовлетворяют критериям (6)

и (8), при этом модель должна игнорировать (не описывать) погрешность исходных данных. Процедура поиска α и $\theta_1 \dots \theta_m$ останавливается, когда впервые выполняется неравенство (8).

Метод поиска $\theta_1 \dots \theta_m$ с использованием априорной информации, составной частью которой является знание погрешностей исходных данных, позволяет получить устойчивое приближенное решение. Без знания погрешностей исходных данных в общем случае могут решаться только корректно поставленные задачи [19], к которым задачи обработки данных многих физических экспериментов не относятся.

При обработке экспериментальных данных, как уже отмечалось, часто используют итерационные алгоритмы, основная идея которых сводится к построению по найденному приближению $\theta(i)$ последующих приближений $\theta(i+1)$. Вычисления повторяются многократно по одним и тем же формулам, полученный результат используется в качестве исходных данных для следующего расчета. Вычисления повторяются до тех пор, пока не будет выполнено некоторое условие, при этом в общую схему итерационных алгоритмов могут быть введены и ограничения на искомые параметры.

При использовании итерационного алгоритма исследователь должен сам решить, когда прервать процесс итераций, руководствуясь теми или иными соображениями, например, выполнением критериев (6) и (8), возникающими после каждой новой итерации. Критерием прекращения процесса вычислений на i -м шаге часто выбирается, например, близость функционала (3) к минимальному значению:

$$S(\theta) \rightarrow \min,$$

близость градиента $\nabla S(\theta)$ к нулю. Помимо этих критериев, используется также выполнение условия малости приращения параметров

$$|\theta(i+1) - \theta(i)| < \varepsilon,$$

где ε - некоторая наперед заданная малая величина, с которой ищется точка минимума функционала (3). Здесь считается, что выполнен критерий остановки, если убывание значения параметра θ на некоторой итерации меньше ε . Возможен и комбинированный критерий, состоящий в одновременном выполнении указанных условий, а также и других критериев.

Как уже отмечалось, если модель, описывающая исследуемый процесс, нелинейная, то возникают и нелинейные обратные задачи. При этом, чем глубже проникновение в суть процесса, тем более существенной оказывается нелинейность. Важным моментом для сходимости алгоритмов при решении нелинейной задачи является выбор начального приближения параметров модели. Функционал (3) может иметь множество локальных минимумов, а глобальный минимум иногда представляет собой набор

решений задачи с одинаковой невязкой. Для выбора единственного решения из возникающего множества используют дополнительную информацию и метод регуляризации [12].

Для описания экспериментальных данных в курсовой работе предлагаются нелинейные модели, построенные в виде зависимостей $f(\xi, \theta)$ на основе эмпирических соображений и известных физико-химических законов (п.2). Параметры этих моделей определяются по экспериментальным концентрационным зависимостям оптической плотности молекул красителя в смеси с ДНК нелинейным методом наименьших квадратов. В качестве численных значений параметров принимаются величины $\theta_1 \dots \theta_n$, полученные в результате минимизации суммы (3 или 4). Численная процедура решения обратной задачи осуществляется методами Бокса и Марквардта. Метод Бокса - прямой метод поиска, в котором для отыскания минимума невязки не используются производные целевой функции. В этом методе направление поиска определяется на основе последовательных вычислений значений суммы $S(\theta)$. Метод Марквардта является комбинацией двух методов: метода с разложением $f(\xi, \theta)$ в ряд Тейлора и метода наискорейшего спуска.

Основная его идея заключается в том, чтобы при высокой степени нелинейности целевой функции, пока «расстояние» между итеративным и искомым решением значительно, используется метод наискорейшего спуска, а при приближении к искомому решению – метод линеаризации.

Поиск параметров связывания красителя с ДНК (K , n и $\Delta\epsilon$) с использованием модели МакГи и фон Хиппеля выполняется путем минимизации целевой функции методом Бокса. Концентрация связанного лиганда $[L_2]$ определяется на каждом цикле минимизации функционала (при вариации каждого из искомых параметров) из решения уравнения (19, п.2) методом Ньютона. Система ограничений строится на базе физического анализа задачи, анализа текущего поведения решения, а также априорной информации о решении.

Ниже представленные программы [см. 15 - 18] предназначены для решения задач, целевая функция которых записывается в виде суммы квадратов.

Список переменных в программе 1:

$M = m$ – число элементов в выборке или число точек измерения.

$N = n = p$ – число параметров.

$EPS = \epsilon$ – значение критерия сходимости.

$H = h$ – шаг дифференцирования.

$fe(i)$ – экспериментальные значения оптической плотности.

$V0(i)$ – концентрация исследуемых молекул.

ri – коэффициент возрастания числа Марквардта.

rd – коэффициент уменьшения числа Марквардта.

$V = \nu$ – число Марквардта.

$f(i)$ – остатки.

RS – сумма квадратов остатков, полученная на предыдущей итерации.

$A(I,J)$ – элементы расширенной матрицы Якоби.....

SN – сумма квадратов остатков текущей итерации.

IT- счётчик основной итерации.

$C(j)$ –оценки параметров.

$A(j)$ – стандартные ошибки параметров.

E – несмещенная оценка дисперсии.

AR – коэффициент детерминации.

RSS – ”остаточная” сумма квадратов остатков (оценка разницы между экспериментальными данными и оценочной моделью) – значение целевой функции.

ПРОГРАММА 1

```
rem DNA - Li. модель СКЭТЧАРДА
rem метод МАРКВАРДА
cls
1 m=14:n=3
  n1=n+1: n2=n+2: m1=m+n: m2=m1+1: m3=m2+1
  dim c(n+1),f(m+1),a(m3+1,n2+1),d1(m+1),fe(m+1),d3(m+1),v1(m),fc(m)
  dim z(m+1),d(n+1,n1+1),u(n+1),v(n+1),ff(m+1),yy(m+1),V0(m),v7(m),G0(m),U2(m)
2 eps=1E-10: h=1E-8
3 t0=2.16
4 ri=sqr(40): rd=sqr(.01)
  read c(1),c(2),c(3):rem Начальные значения параметров
5 data 1300000,20,170
6 Y0=0.3118 : RB=0.0000557: rem Am и [Lo]
  for i=1 to m
read V0(i),fe(i): rem КОНЦЕНТРАЦИИ И ОПТИЧЕСКИЕ ПЛОТНОСТИ
data 0.0267121,0.296200
data 0.0400685,0.285200
data 0.0534242,0.277648
data 0.0667803,0.270423
data 0.0801363,0.259148
data 0.0988348,0.248365
data 0.1469267,0.220093
data 0.1736588,0.194197
data 0.2003409,0.187753
data 0.2404091,0.172170
data 0.3205454,0.152228
data 0.4006818,0.145937
data 0.5075303,0.141812
data 0.8013636,0.138338
next i
```

```

for i=1 to m: V0(i)= V0(i)*0.001: next i: it=1
gosub 2000
v=sqr(.0012)
sn=0:for i=1 to m:sn=sn+f(i)^2:next i
10 rs=sn
print : print "rss=";rs: for i=1 to m:a(i,n1)=f(i):next i
gosub 1000
for i=1 to n :for j=1 to n1:a(m+i,j)=0:next j: a(m+i,i)=v : next i
ic=0
20 gosub 1500
gosub 3000
for i=1 to n:s=0: for j=1 to n:s=s+d(i,j)*d(j,n1):next j: a(i,n2)=-s: next i
for i=1 to n: a(m3,i)=c(i)+a(i,n2):a(m2,i)=c(i):c(i)=a(m3,i): next i
gosub 2000
for i=1 to n:c(i)=a(m2,i):next i
sn=0 : for i=1 to m: sn=sn+f(i)^2:next i: p=abs(c(1)): pp=abs(a(1,n2))
if n=1 then 30
for i=2 to n: if abs(c(i))>p then p=abs(c(i))
if abs(a(i,n2))>pp then pp=abs(a(i,n2)): next i
30 if p<1 then p=1
if rs<sn then sw=1 else sw=0
if pp<=eps*p then 60
if sw=0 then 40
v=v*ri : print "v=";v,: print rs : ic=ic+1
goto 20
40 for i=1 to n : c(i)=a(m3,i) : next i
rem print "-----"
print "it=";it: print: for i=1 to n: print "c(";i;")=";c(i) : next i
if ic>0 then 50
v=v*rd: print: print "v=";v
50 it=it+1
goto 10
60 rem оптимальное решение
print "параметры (it=";it;")"
? "-- Метод Марквардта --- Результаты расчета --- модель Скэтчарда ---19C--"
if sw=1 then sn=rs
goto 70
for i=1 to n: c(i)=a(m3,i): next i
gosub 1000
70 rem
e=sn/(m-n): print
for i=1 to n: for j=1 to n
s=0
for k=1 to m: s=s+a(k,j)*a(k,i): next k
d(i,j) =s: next j: next i
gosub 3000
for i=1 to n
sd=t0*sqr(ABS((e*d(i,i))))
rem Оптимальное решение
print "оценка параметра c(";i;")= "; using "#####.###"; C(I)

```

```

print "погрешность c(";i;"); t0*SD a(";i;")= "; using "#####.###"; sd
next i
ym=0: for i=1 to m
? using "#####.#####";V0(i);fe(i);fc(i);fe(i)-fc(i)
ym=ym+fe(i): next i: ym=ym/m: yd=0
for i=1 to m: yy(i)=(fe(i)-ym)^2: yd=yd+yy(i): next i
ar=1-(m-n-1)*sn/yd
? using " RSS = #####.#####"; sn, using " Коэф детерм = #####.#####";ar
s=0: s1=0: for i=2 to m: s=s+(f(i)-f(i-1))^2: s1=s1+(f(i))^2: next i
? using " критерий Дарбина = ##.#####"; S/Sn, using " Параметр регуляризации=
#.#####^#####";v
goto 4000
1000 rem *****подпрограммы дифференцирования *****
for i=1 to m: a(i,n1)=f(i): next i
for j=1 to n: c(j)=c(j)-h
gosub 2000
for i=1 to m: a(i,n2)=f(i): next i
c(j)=c(j)+2*h
gosub 2000
for i=1 to m: a(i,j)=(f(i)-a(i,n2))/(2*h): next i
c(j)=c(j)-h : next j
return
1498 ? " *** "
1499 t$=inkey$:if t$="" then 1499
? " ** ":stop
1500 rem _____
for i=1 to n:for j=1 to n
s=0
for k=1 to m1: s=s+a(k,i)*a(k,j)
next k
d(i,j)=s: d(j,i)=s: next j:next i
for i=1 to n: s=0
for k=1 to m1: s=s+a(k,i)*a(k,n+1): next k
d(i,n1)=s : next i
for i=1 to n : d(i,i)=d(i,i)+v*v: next i
return
2000 rem _____Вычисление целевой функции_____
c(1)=abs(c(1)): c(2)=abs(c(2)): c(3)=abs(c(3))
for i1=1 to m
G0(i1)= 1/(1*C(1))+RB+v0(i1)/C(2)
T7=sqr(G0(I1)*G0(I1)-4*RB*v0(i1)/C(2))
U2(i1)=abs((1/2)*(G0(i1)-T7))
fc(i1)=(Y0 -(C(3)*U2(i1)))
f(i1)=fe(i1)-fc(i1)
next i1
return
3000 rem ----- Обращение матрицы -----
for i=1 to n : u(i)=0 : v(i)=0: next i
for k=1 to n: xm=0
for j=1 to n

```

```

    if u(j)<>0 then 3002
    for i=1 to n
    if v(i)<>0 or abs(d(i,j))<xm then 3001
    xm=abs(d(i,j)) : q=j : r=i
3001  next i
3002  next j
    u(q)=r : v(r)=q
    for j=1 to n
    if j=q then 3004
    ad(r,j)=d(r,j)/(d(r,q))
    for i=1 to n
    if i=r then 3003
    d(i,j)=d(i,j)-d(r,j)*d(i,q)
3003  next i
3004  next j
    d(r,q)=1/(d(r,q))
    for i=1 to n
    if i=r then 3005
    d(i,q)=-d(r,q)*d(i,q)
3005  next i
    next k
    for k=1 to n
    if k=u(k) then 3006
    for j=1 to n: swap d(k,j),d(u(k),j):next j
    for i=1 to n: swap d(i,k),d(i,v(k)): next i
    u(v(k))=u(k) : v(u(k))=v(k) : u(k)=k : v(k)=k
3006  next k
    return
4000  end

```

-- Метод Марквардта --- Результаты расчета --- модель Скэтчарда ---19С-
 оценка параметра $c(1)$ = 534074.816
 погрешность $c(1)$; $t0*SD\ a(1)$ = 117998.284
 оценка параметра $c(2)$ = 4.559
 погрешность $c(2)$; $t0*SD\ a(2)$ = 0.126
 оценка параметра $c(3)$ = 3148.252
 погрешность $c(3)$; $t0*SD\ a(3)$ = 44.936

0.00002671	0.29620000	0.29401806	0.00218194
0.00004007	0.28520000	0.28518386	0.00001614
0.00005342	0.27764800	0.27639686	0.00125114
0.00006678	0.27042300	0.26766475	0.00275825
0.00008014	0.25914800	0.25899826	0.00014974
0.00009883	0.24836500	0.24700054	0.00136446
0.00014693	0.22009300	0.21723355	0.00285945
0.00017366	0.19419700	0.20179511	-0.00759811
0.00020034	0.18775300	0.18771304	0.00003996
0.00024041	0.17217000	0.17035861	0.00181139
0.00032055	0.15222800	0.15180882	0.00041918
0.00040068	0.14593700	0.14534242	0.00059458

0.00050753	0.14181200	0.14198277	-0.00017077
0.00080136	0.13833800	0.13911599	-0.00077799

rss = 0.000086173 Коэф детерм = 0.98065 it= 1403
критерий Дарбина = 2.2370 Параметр регуляризации = 2.58117E-04

Метод Бокса, идейно близкий к симплексному методу, предложен для задач нелинейного программирования с ограничениями типа неравенств [15,18]. В этом методе вместо вершин симплекса используется произвольный набор вершин, принадлежащих области допустимых значений. Бокс выбрал многогранник с более чем $(p + 1)$ вершинами и назвал его комплексом, соответствующее название имеет и сам метод - комплексный.

В программе 2 вершины комплекса упорядочиваются в соответствии со значениями целевой функции $S(\theta)$. Процедура инициализации вершин комплекса реализуется в программе операторами в строках с номерами до 1000. Затем следует итерационный поиск минимума $S(\theta)$ внутри области ограничений.

Целевая функция вычисляется в подпрограмме, начинающейся с оператора 5000. Ограничения проверяются в подпрограмме, начинающейся с оператора 6000. Переменная IC=1 указывает на то, что были нарушены неявные, а переменная EC=1 – на то, что были нарушены явные ограничения. Массивы EC (J), $J = 1, 2, \dots, 2p$, и IC(L), $L = 1, 2, \dots$, указывают на конкретные ограничения, которые были нарушены.

Выбор числа вершин комплекса $2p$ и $\alpha = 1,3$ является эмпирическим правилом, предложенным Боксом. Число вершин делает метод более гибким, давая возможность комплексу двигаться в различных направлениях. Кроме того, число вершин в некоторой степени препятствует вырождению комплекса, т.е. стягиванию его в подпространство размерности, меньшей p . Коэффициент отражения $\alpha > 1$ позволяет комплексу расширяться и перемещаться в нужном направлении. Перемещения вершин на половину расстояния от исходных положений к центру сжимают комплекс. Поэтому комплекс может перемещаться внутри допустимой области вдоль границ и огибать углы в местах пересечения ограничений.

ПРОГРАММА 2

```
rem DNA - EtBr, модель МакГи и фон ХИППЕЛЯ
rem метод БОКСА
  DEFDBL A-Z: key(1) on: on key(1) gosub 5200
  cls
  zt=0: m=1: n=m+2: n1=2: mm=14
  k=2*n: pp=0: a=1.3
```

```

option base 1
dim x(n),y(n),l(n),u(n),xc(n),xo(n),xr(n),xh(n),ex2(m+1),ex1(m+1),yy(mm)
dim c(k,n),f(k),g(m),ic(m),ec(2*n),k0(m),ye(mm),y5(mm),w2(mm),w3(mm)
dim vv(mm),q(n),wx(mm),wy(mm),w(n1),A6(N1,N1),f3(N1),B(n1),uu(mm,m),PL(mm)
E=1e-5 :EH=1e-17:iks=1000:y0=.3118:V2=0.0557
for i=1 to mm
read PL(i),ye(i):next i:rem концентрации ДНК и оптические плотности BrEt
DATA 0.0267121, 0.3118
DATA 0.0400682, 0.2942890
DATA 0.0534242, 0.2841890
DATA 0.0667803, 0.2798420
DATA 0.0801363, 0.2707510
DATA 0.0988348, 0.2641760
DATA 0.1469166, 0.2470570
DATA 0.1736288, 0.2247920
DATA 0.2003041, 0.2210900
DATA 0.2404091, 0.2082220
DATA 0.3205455, 0.1917940
DATA 0.4006818, 0.1742630
DATA 0.5075303, 0.1633750
DATA 0.8013636, 0.1472790
for j=1 to n:rem Значения верхних и нижних границ
read l(j),u(j)
data .01,3
data 1,5
data 1,5
next j
470
for i8=1 to mm: wx(i8)=V2/5: wy(i8)=wx(i8): next i8
rem
480 for j=1 to n:x(j)=(l(j)+u(j))/2:c(1,j)=x(j):xc(j)=x(j):next j
490 randomize timer
500 i8=1
fe=0
525 gosub 5000:f(1)=z
600 i8=i8+1
620 for j=1 to n:c(i8,j)=l(j)+rnd(77)*(u(j)-l(j)):x(j)=c(i8,j):next j
640 im=1:gosub 6000
660 if ic=1 then goto 720
680 for j=1 to n:xc(j)=((i8-1)*xc(j)+c(i8,j))/i8:next j
700 goto 761
720 for j=1 to n:c(i8,j)=(c(i8,j)+xc(j))/2:x(j)=c(i8,j):next j
740 goto 640
761 gosub 5000:f(i8)=z
780 if i8<k goto 600
800 for j=1 to (k-1)
820 for i8=j+1 to k
840 if f(j)<=f(i8) goto 900
860 f=f(j):f(j)=f(i8):f(i8)=f
880 for l=1 to n:y(l)=c(j,l):c(j,l)=c(i8,l):c(i8,l)=y(l):next l

```

```

900 next i8:next j
920 fm=f(1)
rem ? "Первая точка"
rem ? "Минимальное значение ="f(1)
rem ? "Минимальная точка"
rem 1060 for l=1 to n:? "x";l,c(1,l):next l
1200 for l=1 to n:xh(l)=c(k,l):xo(l)=(k*xc(l)-xh(l))/(k-1):next l
1400 for l=1 to n:xr(l)=(1+a)*xo(l)-a*xh(l):x(l)=xr(l):next l
1500 im=0
1520 gosub 6000
1540 if ec=0 and ic=0 then goto 2000
1600 if ec=0 then goto 1800
1620 for j=1 to n
1640 if ec(j)=1 then xr(j)=l(j)+1e-5:x(j)=xr(j)
1660 if ec(j+n)=1 then xr(j)=u(j)-1e-5:x(j)=xr(j)
1680 next j
1800 if ic=0 then goto 2000
1820 for l=1 to n :xr(l)=(xr(l)+xo(l))/2:x(l)=xr(l):next l
1840 goto 1500
2000
2001 gosub 5000
    if fe > 1100 goto 480
    fr=z
2020 if fr<f(k) goto 2410
2040 for l=1 to n:xr(l)=(xr(l)+xo(l))/2:x(l)=xr(l):next l
2060 goto 1500
2410 f(k)=fr
2420 for l=1 to n
2440 xc(l)=k*xc(l)-c(k,l)+xr(l)
2460 xc(l)=xc(l)/k:c(k,l)=xr(l)
2480 next l
2500 for j=1 to (k-1)
2520 for i8=j+1 to k
2540 if f(j)<=f(i8) goto 2600
2560 f=f(j):f(j)=f(i8):f(i8)=f
2580 for l=1 to n:y(l)=c(j,l):c(j,l)=c(i8,l):c(i8,l)=y(l):next l
2600 next i8:next j
rem Если наименьшее значение функции уменьшено,
rem выставить признак печати
2620 if f(1)<fm then pp=1
rem Если уменьшение функции не обнаружено, то проверка критерия
rem завершения поиска минимума не производится
2640 if pp=0 then goto 1200
rem Найти отклонение значений функции
3000 s1=0:s2=0
3020 for i8=1 to k:s1=s1+f(i8):s2=s2+f(i8)*f(i8):next i8
3040 sd=abs(s2-s1^2/k):sd=sd/k
rem Найти максимальное расстояние между точками комплекса
3100 dm=0
3120 for i8=1 to (k-1):for j=i8+1 to k

```

```

3140 d=0
3160 for l=1 to n:d=d+(c(i8,l)-c(j,l))^2:next l
3180 d=sqr(d)
3200 if d>dm then dm=d
3220 next j:next i8
3400 if pp=0 then 3800
rem ? "Новая точка в строке 3500"
rem ? "Минимальное значение="f(1)
rem ? "Точки минимума"
rem ? spc(29) "гр.      гр."
3560 for i=1 to n:q(i)=c(1,i):next i
?
for i8=1 to n: ? USING "#####.## ";l(i8);c(1,i8);u(i8): next i8
ym=0
for i8=1 to mm: ym=ym+ye(i8): next i8
ym=ym/mm: yd=0
for i8=1 to mm: yy(i8)=(ye(i8)-ym)^2: yd=yd+yy(i8): next i8
ar=1-(mm-n-1)*F(1)/yd
600 fm=f(1):pp=0
rem Проверка сходимости
locate 3,60: ? using "###.#####^#####";sd
locate 4,60: ? using "###.#####^#####";dm
3800 if sd>1e-8 then goto 1200
3801 if dm>2e-3 then goto 1200
if f(1) > iks then goto 1200
iks=f(1): print: print
for j=1 to mm
? USING "#####.##### ";PL(j),wy(j),V2-wy(j),ye(j),y5(j),ye(j)-y5(j): next j
locate 23,3
? using"C(1)=##### ";100000*c(1,1),using "C(2)=###.##";c(1,2),using"C(3)=###.##"; 1000*c(1,3)
?
? using" RSS = #####.#####"; F(1), using " Коэф детерм = #####.#####";ar
?
? using" dm = #####.#####"; dm, using " IT = #####.#####";fe
goto 480
locate 40,10: ? "stop";
4100 stop
5000
gosub 11000
z=0
for i1=1 to mm
Y5(i1)=abs(Y0-(x(3)*Wy(i1)))
z=z+(ye(i1)-y5(i1))^2
next i1
5020 locate 2,2
?"----- Результаты расчета ----- модель МакГи и фон Хиппеля ----55----"
5050 fe=fe+1: locate 1,60:? using "#####";fe
return
5200 ? " *** "
5300 t$=inkey$:if t$="" then 5300

```

```

? " ** ":stop
return
6000 for ii=1 to k:ec(ii)=0:next ii:ec=0
6020 for ii=1 to m:ic(ii)=0:next ii:ic=0
6100 for ii=1 to n
6120 if x(ii)<l(ii) then ec(ii)=1:ec=1
6140 if x(ii)>u(ii) then ec(n+ii)=1:ec=1
6160 next ii
8000 RETURN
11000 i3=0
11005 HU=0
11010 i3=i3+1
11020 W(1)=WX(i3):W(2)=WY(i3)
11070 S=0
11210 GOSUB 11660
11220 FOR I=1 TO N1:B(I)=-F3(I):NEXT I
11250 FOR JJ=1 TO N1
11260 W=W(JJ)
11270 H=E*ABS(W)
11280 W(JJ)=W+H
11290 GOSUB 11660
11300 FOR I=1 TO N1:A6(I,JJ)=((F3(I)+B(I))/H+EH): NEXT I
11330 W(JJ)=W
11340 NEXT JJ
11350 S=S+1
11370 FOR I=1 TO N1-1
11380 FOR JJ=I+1 TO N1
11390 A6(JJ,I)=-A6(JJ,I)/(A6(I,I)+EH)
11400 FOR K1=I+1 TO N1
11410 A6(JJ,K1)=A6(JJ,K1)+A6(JJ,I)*A6(I,K1)
11420 NEXT K1
11430 B(JJ)=B(JJ)+A6(JJ,I)*B(I)
11440 NEXT JJ
11450 NEXT I
11460 F3(N1)=B(N1)/(A6(N1,N1)+EH)
11470 FOR I=N1-1 TO 1 STEP -1
11480 H=B(I)
11490 FOR JJ=I+1 TO N1:H=H-F3(JJ)*A6(I,JJ):NEXT JJ
11520 F3(I)=H/(A6(I,I)+EH)
11540 NEXT I
11550 R=0
11560 FOR I=1 TO N1
11570 W(I)=W(I)+F3(I)
11580 IF ABS(F3(I)/W(I))>E THEN R=1
      IF HU>5000 then R=0
11590 NEXT I
11600 IF R=1 THEN 11210
11610 WX(i3)=W(1)
11620 WY(i3)=W(2)
      IF HU>5000 then GOTO 11760

```

```

11630 IF i3<Mm GOTO 11010
11660 Q=W(1):O=W(2)
      IF q >V2 then Q=V2*.01*i3 :GOTO 11725
      IF Q < 0 THEN Q=V2*.01*i3: GOTO 11725
      R0=Q/PL(i3): IF (V2-Q) < 0 THEN GOTO 11725
      R1= R0/(V2-Q):R2= 1-X(2)*R0
      IF R2< 0 THEN R2=.1: GOTO 11725
      R3=(X(2)-1)*LOG(R2/(R2+R0))
11665 f3(1)=-LOG(R1)+LOG(100*X(1))+LOG(R2)+R3
      IF O > PL(i3) then O=V2*.01*i3 :GOTO 11725
      IF O < 0 THEN O=V2*.01*i3: GOTO 11725
      R0=O/PL(i3):IF V2-O < 0 THEN GOTO 11725
      R1= R0/(V2-O): R2= 1-X(2)*R0
      IF R2< 0 THEN GOTO 11725
      R3=(X(2)-1)*LOG(R2/(R2+R0))
11710 f3(2)=-LOG(R1)+LOG(100*X(1))+LOG(R2)+R3
      HU=HU+1
11725 W(1)=Q:W(2)=O
11760 RETURN

```

----- Результаты расчета ----- модель МакГи и фон Хиппеля -----

0.01	0.21	3.00				15.962059E-05
1.00	3.29	5.00				26.376615E-01
1.00	3.64	5.00				
0.026712	0.004290	0.051410	0.311800	0.298134	0.013666	
0.040068	0.006383	0.049317	0.294289	0.291467	0.002822	
0.053424	0.008438	0.047262	0.284189	0.284919	-0.000730	
0.066780	0.010454	0.045246	0.279842	0.278497	0.001345	
0.080136	0.012429	0.043271	0.270751	0.272207	-0.001456	
0.098835	0.015119	0.040581	0.264176	0.263637	0.000539	
0.146917	0.021600	0.034100	0.247057	0.242992	0.004065	
0.173629	0.024899	0.030801	0.224792	0.232481	-0.007689	
0.200304	0.027960	0.027740	0.221090	0.222732	-0.001642	
0.240409	0.032095	0.023605	0.208222	0.209558	-0.001336	
0.320546	0.038655	0.017045	0.191794	0.188660	0.003134	
0.400682	0.043177	0.012523	0.174263	0.174256	0.000007	
0.507530	0.046943	0.008757	0.163375	0.162259	0.001116	
0.801364	0.051303	0.004397	0.147279	0.148370	-0.001091	

C(1)= 24804 C(2)= 3.94 C(3)= 3185.6

RSS = 0.000291853 Коэф детерм = 0.91781

dm = 0.000059854 IT = 513

5. ОЦЕНКА ΔH , ΔS И ΔG КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЯ МОЛЕКУЛ

Рассчитав константу равновесия при различных температурах, можно оценить термодинамические параметры комплексообразования с помощью соотношений:

$$\Delta G = -RT \ln K, \quad \Delta(\ln K)/\Delta(1/T) = -\Delta H/R, \quad \Delta S = -(\Delta G - \Delta H)/T.$$

Оценка изменения энтальпии ΔH , энтропии ΔS и свободной энергии Гиббса ΔG при комплексообразовании молекул, проводится в предположении линейной зависимости $\ln K$ от $1/T$ в исследуемом температурном диапазоне. Числовые значения ΔH , ΔS и ΔG позволяют сделать вывод о вовлечении различных физических факторов в стабилизацию комплексов лиганд - ДНК.

Пусть при температуре T_1 значение константы равновесия равно K_1 , а при температуре T_2 - K_2 соответственно.

Связь между константой равновесия, свободной энергией Гиббса и температурой, при которой наступает динамическое равновесие молекул, представим уравнением Вант – Гоффа:

$$\Delta G_1^0 = -RT_1 \ln K_1. \quad (1)$$

$$\Delta G_2^0 = -RT_2 \ln K_2. \quad (2)$$

Если считать, что в рассматриваемом температурном интервале от T_1 до T_2 ΔH и ΔS реакции не изменяются, то ΔG_1^0 и ΔG_2^0 запишем в виде

$$\Delta G_1^0 = \Delta H - T_1 \Delta S, \quad (3)$$

$$\Delta G_2^0 = \Delta H - T_2 \Delta S. \quad (4)$$

С учетом формул (1)- (4), K_1 и K_2 представим в виде

$$\ln K_1 = -\frac{\Delta G_1^0}{RT_1} = -\frac{\Delta H - T_1 \Delta S}{RT_1}, \quad (5)$$

$$\ln K_2 = -\frac{\Delta G_2^0}{RT_2} = -\frac{\Delta H - T_2 \Delta S}{RT_2}. \quad (6)$$

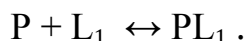
Вычитая из (6) уравнения (5), получим следующую формулу:

$$\ln K_2 - \ln K_1 = -\frac{\Delta H}{R} \cdot \frac{T_1 - T_2}{T_1 T_2} \quad \text{или} \quad \Delta(\ln K)/\Delta(1/T) = -\Delta H/R. \quad (7)$$

Уравнение (7) широко используется в биофизических расчетах для нахождения тепловых эффектов. По этому уравнению, зная K_1 и K_2 при двух разных температурах, можно рассчитать ΔH реакции. Соответственно, зная ΔH реакции и константу равновесия при одной температуре, можно рассчитать константу равновесия при другой температуре.

Энтропию можно получить из свободной энергии Гиббса (1) и энтальпии (7) по формуле (3).

Из уравнения (7) следует, что при $\Delta H < 0$ реакция является экзотермической (теплота выделяется). При повышении температуры раствора константа равновесия уменьшается и равновесие смещается в сторону образования исходных веществ



При $\Delta H > 0$, реакция эндотермическая, теплота поглощается. При повышении температуры раствора константа увеличивается и равновесие смещается в сторону образования продуктов реакции.

В случае, когда $\Delta H = 0$, константа не зависит от изменения температуры.

Каждый из найденных термодинамических параметров представляет собой величину, учитывающую различные виды взаимодействий при образовании комплексов. Энтальпию комплексообразования красителя с двуспиральной ДНК можно представить в виде суммы следующих факторов ($\Delta H = \sum_{i=1}^6 H_i$) [20]: раздвижения находящихся в состоянии вертикального стэкинг - взаимодействия пар оснований в дуплексе с образованием полости для встраивающейся молекулы (ΔH_1); стэкинг - взаимодействия азотистых оснований с хромофором красителя в месте интеркаляции (ΔH_2); электростатических взаимодействий между катионами красителя и отрицательным зарядом фосфатных групп нуклеотидов (ΔH_3); изменения сольватной оболочки при образовании комплекса (ΔH_4); изменение конфигурации лиганда при связывании с ДНК (ΔH_5); специфических водородных связей, которые может образовывать краситель в комплексе (ΔH_6). Отрицательный энтальпийный вклад обычно вносят слагаемые ΔH_2 , ΔH_3 и ΔH_6 , а положительный - ΔH_1 , ΔH_4 и ΔH_5 . При оценке величины ΔH могут быть учтены также дополнительные составляющие, в частности, в том случае, если интеркалятор вызывает значительные конформационные изменения в ДНК.

ЛИТЕРАТУРА

1. Watson J.D., Crick F.H.C. The structure of DNA //Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology. – Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1953. - V.18 - P. 123-131.
2. Crick F. H. C., Watson J. D. The complementary structure of deoxyribonucleic acid //Proceedings of the Royal Society of London A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences. – The Royal Society, 1954. – V. 223. – № 1152. – P. 80-96.
3. Зенгер В. Принципы структурной организации нуклеиновых кислот. – М.: Мир. – 1987.
4. Сибилева М.А., Морошкина Е. Б. Руководство к лабораторному практикуму по молекулярной биофизике. – СПб.: СПбГУ, 2006, С.104
5. Барановский С.Ф., Болотин П.А., Евстигнеев М.П., Чернышев Д.Н. Комплексообразование гетероциклических лигандов с ДНК в водном растворе. Журн. прикладной спектроскопии, 2008. – Т.75. – № 2. – С. 242–249.
6. Барановский С.Ф., Болотин П.А., Евстигнеев М.П., Чернышев Д. Н. Взаимодействие бромистого этидия и кофеина с ДНК в водном растворе // Журн. прикладной спектроскопии, 2009. Т. 76. № 1. С. 143-151.
7. Осинникова Д.Н. Взаимодействие молекулы ДНК с синтетическими аналогами антибиотиков и алкалоидов различной структуры, канд. дисс. – СПб.: СПбГУ, 2016, 118 с
8. Веселков А. Н., Морошкина Е. Б., Соболева О. И., Фрисман Э. В. Сравнительное исследование взаимодействия ДНК с дауномицином и профлавином в растворе // Молек. биология. 1984. – Т. 18. – Вып. 2. – С. 481–487.
9. Барановский С.Ф., Мухина Ю.В., Чернышев Д.Н., Бучельников А.С. Спектроскопия молекул в ассоциированном состоянии, методические указания. Изд - во СевНТУ, 2012. Ч.2.– 50 с.
10. McGhee J.D., von Hippel P.H. Theoretical aspects of DNA-protein interactions: cooperative and non-cooperative binding of large ligands to a one-dimensional homogeneous lattice // J. Mol. Biol. - 1974. – V. 86. – № 2. – P.463 - 489.
11. Кантор Ч., Шимел П. Биофизическая химия. - Т. 1-3. - М.: Мир, 1984.
12. Тихнов А.Н., Арсенин В.Я. Методы решения некорректных задач - М.:Наука.-1979.-285с.
13. Ватульян А.О. Математические модели и обратные задачи // Соросовский образовательный журнал. - 1998, №11. - С.143–148.
14. Барановский С.Ф., Мухина Ю.В. Оценивание параметров математических моделей по экспериментальным данным, методические указания. - Севастополь: Изд-во СевНТУ, 2013. - Ч.3. - 44 с.

15. Банди Б. Методы оптимизации. Вводный курс. - М.: Радиосвязь.- 1988.-128с.
16. Тихонов А.Н., Гончарский А.В., Степанов В.В., Ягола А.Г. Численные методы решения некорректных задач - М.: Наука.- 1990.-230с..
17. Евсеев А.М. Николаев Л.С. Математическое моделирование химических равновесий.- М.: МГУ, 1988. - 192 с.
18. Барановский С.Ф., Чернышев Д.Н. Спектрофотометрическое исследование гетероциклических молекул в ассоциированном состоянии. Монография. Электронный ресурс / Под ред. М.П.Евстигнеева.- Электронные текстовые данные.- Севастополь: СевГУ, 2018.-108 с.- Режим доступа: <http://lib.sevsu.ru: 8080/xmlui/handle/123456789/8185>.
- Леонов А.С., Ягола А.Г. Можно ли решить некорректно поставленную задачу без знания погрешностей данных? – М.: Вест. МГУ Сер.3. Физика, Астрономия, 1996. – Т. 36, № 4. – С. 28-33.
20. Hopkins H. P., Fumero J., Wilson W.D. Temperature dependence of enthalpy changes for ethidium and propidium binding to DNA // Biopolymers.- 1990.- V. 29 - P.445 - 459.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации

ФГАОУВО "Севастопольский государственный университет"

Кафедра " Физика"

КУРСОВАЯ РАБОТА

по дисциплине " Молекулярная спектроскопия "

ТЕМА КУРСОВОЙ РАБОТЫ В СООТВЕТСТВИИ С ЗАДАНИЕМ

Выполнил(а): студент(ка)
_____ курса _____ группы
(Ф.И.О. студента)

Научный руководитель: (уч.
звание, Ф.И.О.)

Севастополь 20__

Рисунок 1 – Пример оформления титульного листа

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

Исходные спектрофотометрические данные к курсовым работам
Спектры поглощения водных растворов ”краситель - ДНК”

	Вариант 1		Вариант 2	
	55° 1(1)	35° 1(2)	50° 2(1)	30° 2(2)
Конц. ммоль/л	$A_0 = 0.3118$ $RB([L_0]) =$ $=0.0557$ ммоль/л	$A_0 = 0.3118$ $RB([L_0]) =$ $=0.0557$ ммоль/л	$A_0 = 0.3118$ $RB([L_0]) =$ $=0.0557$ ммоль/л	$A_0 = 0.3118$ $RB([L_0]) =$ $=0.0557$ ммоль/л
$[P_0]$	A	A	A	A
0.02671	0.298572	0.296267	0.297326	0.296906
0.04007	0.294289	0.290604	0.293627	0.290551
0.05342	0.284189	0.278658	0.282794	0.278654
0.06678	0.279842	0.272348	0.277810	0.272418
0.08014	0.270751	0.261533	0.268378	0.260407
0.09883	0.264176	0.254493	0.262013	0.252709
0.14692	0.247057	0.228699	0.246023	0.225350
0.17363	0.224792	0.205595	0.220346	0.203433
0.20030	0.221090	0.200590	0.216500	0.195544
0.24041	0.208222	0.185808	0.201883	0.181108
0.32055	0.191794	0.164773	0.182133	0.159452
0.40068	0.174263	0.153565	0.168667	0.150321
0.50753	0.163375	0.147194	0.158128	0.144717
0.80136	0.147279	0.139951	0.144086	0.138506

	Вариант 3		Вариант 4	
	40° 3(1)	25° 3(1)	23° 4(1)	35° 4(2)
Конц. ммоль/л	$A_0 = 0.3118$ $RB([L_0]) =$ $=0.0557$ ммоль/л	$A_0 = 0.3118$ $RB([L_0]) =$ $=0.0557$ ммоль/л	$A_0 = 0.3118$ $RB([L_0]) =$ $=0.0557$ ммоль/л	$A_0 = 0.3118$ $RB([L_0]) =$ $=0.0557$ ммоль/л
$[P_0]$	A	A	A	A
0.02671	0.294710	0.296320	0.293424	0.296267
0.04007	0.288881	0.290643	0.284210	0.290604
0.05342	0.277883	0.278730	0.275939	0.278658
0.06678	0.272170	0.271398	0.267176	0.272348
0.08014	0.260963	0.259987	0.258512	0.261533
0.09883	0.257326	0.250045	0.246577	0.254493
0.14692	0.235494	0.222423	0.217255	0.228699
0.17363	0.209954	0.198005	0.202165	0.205595
0.20030	0.205713	0.191424	0.188365	0.200590
0.24041	0.190930	0.176911	0.171620	0.185808
0.32055	0.170502	0.154302	0.151199	0.164773
0.40068	0.157836	0.147868	0.144606	0.153565
0.50753	0.150616	0.142218	0.141756	0.147194
0.80136	0.141234	0.138068	0.139745	0.139951

	Вариант 5		Вариант 6	
	19° 5(1)	30° 2(2)	55° 1(1)	25° 3(1)
Конц. ммоль/л	$A_0 = 0.3118$ $RB([L_0]) =$ $=0.0557$ ммоль/л	$A_0 = 0.3118$ $RB([L_0]) =$ $=0.0557$ ммоль/л	$A_0 = 0.3118$ $RB([L_0]) =$ $=0.0557$ ммоль/л	$A_0 = 0.3118$ $RB([L_0]) =$ $=0.0557$ ммоль/л
$[P_0]$	A	A	A	A
0.02671	0.296200	0.296906	0.298572	0.296320
0.04007	0.285200	0.290551	0.294289	0.290643
0.05342	0.277648	0.278654	0.284189	0.278730
0.06678	0.270423	0.272418	0.279842	0.271398
0.08014	0.259148	0.260407	0.270751	0.259987
0.09883	0.248365	0.252709	0.264176	0.250045
0.14692	0.220093	0.225350	0.247057	0.222423
0.17363	0.194197	0.203433	0.224792	0.198005
0.20030	0.187753	0.195544	0.221090	0.191424
0.24041	0.172170	0.181108	0.208222	0.176911
0.32055	0.152228	0.159452	0.191794	0.154302
0.40068	0.145937	0.150321	0.174263	0.147868
0.50753	0.141812	0.144717	0.163375	0.142218
0.80136	0.138338	0.138506	0.147279	0.138068

	Вариант 7		Вариант 8	
	50° 7(1)	19° 5(1)	40° 3(1)	23° 4(1)
Конц. ммоль/л	$A_0 = 0.3118$ $RB([L_0]) =$ $=0.0557$ ммоль/л	$A_0 = 0.3118$ $RB([L_0]) =$ $=0.0557$ ммоль/л	$A_0 = 0.3118$ $RB([L_0]) =$ $=0.0557$ ммоль/л	$A_0 = 0.3118$ $RB([L_0]) =$ $=0.0557$ ммоль/л
$[P_0]$	A	A	A	A
0.02671	0.297326	0.296200	0.294710	0.293424
0.04007	0.293627	0.285200	0.288881	0.284210
0.05342	0.282794	0.277648	0.277883	0.275939
0.06678	0.277810	0.270423	0.272170	0.267176
0.08014	0.268378	0.259148	0.260963	0.258512
0.09883	0.262013	0.248365	0.257326	0.246577
0.14692	0.246023	0.220093	0.235494	0.217255
0.17363	0.220346	0.194197	0.209954	0.202165
0.20030	0.216500	0.187753	0.205713	0.188365
0.24041	0.201883	0.172170	0.190930	0.171620
0.32055	0.182133	0.152228	0.170502	0.151199
0.40068	0.168667	0.145937	0.157836	0.144606
0.50753	0.158128	0.141812	0.150616	0.141756
0.80136	0.144086	0.138338	0.141234	0.139745

Учебное издание

**ОЦЕНИВАНИЕ ПАРАМЕТРОВ СВЯЗЫВАНИЯ
ГЕТЕРОЦИКЛИЧЕСКИХ ЛИГАНДОВ
С ПОЛИМЕРНОЙ ДНК
ПО ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ ДАННЫМ
СПЕКТРОФОТОМЕТРИИ**

Учебно-методическое пособие

Составители: **Барановский** Сергей Федорович,
Воронин Дмитрий Петрович

Редактор – О.В. Дмитриева

Изд. № 3/19. Объем 2,75 п.л.
РИИЦМ ФГАОУ ВО «Севастопольский государственный университет»