



论文

选择性培养条件下细菌抗性突变体发生机制研究方法的探讨——对 Luria-Delbrück 实验结果的不确定性分析

金建玲^①, 魏刚^②, 杨维强^②, 张怀强^①, 高培基^{①*}^① 山东大学生命科学学院, 微生物技术国家重点实验室, 济南 250100;^② 山东大学数学和系统科学学院, 济南 250100

* 联系人, E-mail: gaopj@sdu.edu.cn

收稿日期: 2012-04-20; 接受日期: 2012-09-07

摘要 Luria-Delbrück 的推断被公认为遗传学上开创性的经典研究, 并被沿用于抗药性产生机理的分析. 近年来, 适应性突变现象的发现, 引发了对此难题的再次争议. 系列微生物学观察表明, 在不同浓度药物存在的条件下, 耐药/抗药性细胞的发生和增值都是依赖于时间的过程函数, 它并不符合“既不依赖于存在量, 又独立于时间过程”的 Poisson 分布的限定条件. 同时, 由于细菌细胞分裂后并不立即完全分离开, 而是呈一定的聚集状态存在, 因此, 在药物平板上出现的菌落, 是由来源数目不等的耐/抗性菌细胞历经不同分裂次数增殖过程所形成, 以其作为等值进行统计分析, 必然会失真. 本文对 Luria-Delbrück 波动试验中 13 组 310 个数据的重新分析表明, 它们大都存在高端异常值, 这正是上述 2 类时间变量不同步变化所导致的结果, 所以其均值不能作为期望值的无偏估计. 同时, 2 类抽样方式得到的均值/方差比值也不具备等价可比性. 应用多种统计分析方法对 Luria-Delbrück 数据的分析表明, 它不呈 Poisson 分布, 而是呈聚集分布. 综合上述分析, Luria-Delbrück 波动试验所呈现的相对于 Poisson 分布的差异, 有更大可能性是实验设计本身的系统偏差, 而非一般所期望的用以区分细菌突变是否受环境压力所诱导的主要依据. 这表明 Luria-Delbrück 由于对抗性突变体的发生和增殖规律认识不足而错用了统计分析方法, 从而导致了统计推断的失真. 本文对此历史性误解的阐明, 将推动对细菌抗药性发生机理研究的进展.

关键词细菌
突变
随机过程
Poisson 分布
统计检验
聚集分布

遗传学上把无外源性 DNA 损伤因子(如诱变剂)存在时, 以小概率发生的 DNA 碱基序列的置换(substitution)、插入和缺失(insertion/deletion)等序列趋异变化称为自发性突变(spontaneous mutation), 但是

对在选择条件/或损伤条件下发生序列趋异变化是否为诱发性突变(induced mutation)以及自发性突变能否发生如此多样化的抗性突变体, 历来有争议. 携带突变基因的细胞称为突变体(mutant), 对突变类型的

研究主要基于在一定条件下观察到的相应的突变体表型(phenotype). 对细菌突变体的研究, 则源于在选择条件/或非选择条件下, 自琼脂平板上分离得的菌落, 但通常难以从菌落表型上区分这两类突变, 而这正是判别抗性突变是源于自发突变或诱发突变的关键所在.

遗传学认为 DNA 序列的变化只是表型表达的必要而不是充分条件. 而表观遗传学的研究则认为部分表型的发生和表达, 并不取决于 DNA 序列的变化^[1]. 由表型的发生推断 DNA 序列的变化至为复杂, 涉及在选择性条件下突变的发生机制(如细菌抗药性突变株的发生和扩增与相应的抗菌药物使用之间的因果关系), 历来存在争议. Luria 和 Delbrück^[2]根据波动试验(fluctuation test)的结果, 以方差(S^2)与均值($\bar{x}$)的比值的比较为依据, 提出 *E. coli* 菌株抗 T1 噬菌体突变株的发生, 与 T1 噬菌体的存在无关的推断, 接着被 Newcombe^[3]以平板涂布实验(spread plate)所证实. 后来, Lederberg 和 Lenderberg^[4]以影印实验(replate plate)直接检出了 *E. coli* 对链霉素的抗性突变体, 被认作证实 Luria 和 Delbrück 推断的直接证据. 此后类似的实验也表明细菌抗多种噬菌体(T1~T7)和抗青霉素、链霉素、磺胺药等多种药物的抗性突变株的发生与噬菌体和药物的存在无关, 它们存在时造成的致死性选择压力只是杀死敏感的细菌细胞, 从而使已存在的抗性细菌细胞得以扩增成突变菌落而被检出的条件^[2,5].

Cairns 等人^[6]观察到 *E. coli* 乳糖利用缺陷的突变株 F'40 lacZ^- 的一系列独立液体培养物涂布在以乳糖为唯一碳源的非致死性选择平板上时, 2~3 天后各平板上出现的能利用乳糖的 lacZ^+ 回复突变菌落数差别很大, 不呈 Poisson 分布; 这与 Luria 和 Delbrück 在波动试验中得到的非 Poisson 分布结果相似. 可是, 在随后长期乳糖饥饿培养过程中, 在各平板上不断出现的 lacZ^+ 回复突变菌落数的差别小, 呈 Poisson 分布; 这与 Luria 和 Delbrück 在波动试验中得到的非 Poisson 分布结果相反. Cairns 等人^[6]结合其他遗传学证据, 认为乳糖的存在有利于乳糖缺陷株 lacZ^- 发生高频率的回复突变, 因此提出了“非致死的选择条件下, 细菌具有选择发生利于生存突变的能力”. 此后, 细菌在非致死的选择压力下长期培养时, 有利生存的突变可以高频率发生, 其频率之高远远超出自发突变的预期值的现象, 被广泛证实并被称之为适应

性突变, 从而引发了新拉马克主义和新达尔文主义之争^[7]. 是否符合 Poisson 分布, 被认为是区别选择条件下的适应性突变与自发的随机突变的主要判据的数学基础.

Luria 和 Delbrück 观测到取自不同培养时间的 *E. coli* B 菌株的培养液, 涂布于 LB 琼脂平板上后喷入足量 T1 噬菌体, 经过培养后计数各平板上出现的抗性菌落数. 由于在预培养过程中 *E. coli* B 敏感细胞数是依 $N_t = N_0 \cdot 2^n$ 方式增殖(n 为分裂次数), 呈现规律性的指数性增长, 无波动现象. 因此, 抗性菌落数的波动应与其无关. 而自发性突变可在接触噬菌体之前的不同培养时间随机发生, 经细胞分裂增殖后, 产生的子代突变细胞数则各有不同, 被称为累积效应(jackpot). 这样, 来源于一系列独立预培养液, 经随机抽样得到的培养物, 累积的突变细胞已经存在于接种液中, 其在各个平板上出现的突变菌落数, 就应存在极大波动. 这种波动现象被后来的研究者称为“Luria-Delbrück”分布. 此后, 独立培养物中突变细胞是否呈现“Luria-Delbrück”分布成为区分突变发生是自发的随机突变还是诱发的适应性突变的判据, 并一直沿用至今^[5].

Luria-Delbrück 假设: 如果突变仅发生在细菌接触了噬菌体之后经其诱导产生, 由于在 LB 琼脂平板上培养时, 细菌细胞增殖规律相同, 噬菌体的侵染力也基本相近, 因此, 由来源于同一培养液重复抽样得到的培养物(图 1A), 其在各个平板上出现的突变菌落数应该相近, 不会出现很大波动, 服从 Poisson 分

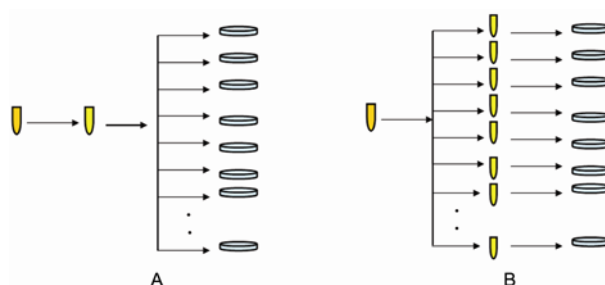


图1 Luria-Delbrück 波动试验的取样方式示意图

从橘色试管中将预培养液移入黄色试管中, A 为 1 管, B 为 n 管; 此时, 管中的细菌细胞数为 ≤ 1000 CFU/mL. 经培养后从黄色管中取样涂布到 LB 平板上然后涂布 T1 噬菌体以检验抗性菌落数, 取样时管中的细菌细胞数约为 $1.2 \times 10^9 \sim 4.0 \times 10^9$ CFU/mL. A 为从 1 个独立培养管中抽取 n 次, 共涂布了 n 个平板; B 为从 n 个不同的独立培养管中各抽取 1 次, 同样涂布了 n 个平板

布, 即方差与均值的比值应近似等于 1.

细菌的自发和诱发突变都是小概率事件, 难以由表型上区分这 2 类突变体, 如果对不同培养条件下细菌抗性突变型菌落数的波动现象进行统计分析, 将有助于对此难题的分析. 因此 Luria-Delbrück 的波动试验被誉为用统计分析方法解决生物学难题的范例. 但是, 其波动试验中的液体独立培养物(小试管)中突变细胞有两种来源: 一是来源于新发生的突变事件, 二是来源于已存在于培养物中的突变细胞的分裂增殖, 因此取样涂布平板时培养物中的突变细胞数是受培养物中细菌细胞数和培养时间复合影响的过程函数, 分别对其准确测定至为复杂, 其概率分析方法也存在争论, 迄今还未能得到对“Luria-Delbrück”分布的一致性认识: 尽管条件矩估计、最小 χ^2 估计、最大似然估计法等方法都曾应用于此研究^[8~21], 并已建立 FALCOR 网, 可进行 Luria-Delbrück 波动试验的统计分析^[22]. 因为波动试验不仅是准确测定突变率的必要条件, 而且它还直接涉及抗菌药物的应用与细菌抗药性突变发生的关系^[23,24], 对该问题的探求, 剖析其来龙去脉, 仍然是生物学中需要解决的基本问题之一, 对此问题的阐明也可为如何应用统计分析方法解决生物学问题提供启示.

本文依据近年来微生物学、分子生物学的相关进展^[25~33], 结合本实验室系列研究^[34~43], 首先对提出 Luria-Delbrück 假设的微生物学依据给出分析, 同时

指出 Luria 和 Delbrück 对观察数据统计分析中的局限性和失误, 进而重新对 Luria-Delbrück 观察数据进行一系列统计分析并给出相应的推断. 对 Newcombe 平板涂布实验也给出相应的微生物学分析和重新认识, 由此提出了区分两类突变的策略.

1 Luria-Delbrück 假设的局限性

1.1 Luria-Delbrück 的实验设计

Luria-Delbrück 设计了相当复杂的多因素条件实验以检验其假设. 实验分为 A, B, C 和 D 4 组共 13 个样本, 计 310 个抽样数据. 为了保证实验起始时独立培养物中没有抗性突变细胞的存在, 所有实验的起始细胞数均是 $\leq 50\sim 500$ CFU/培养物(CFU, clony forming units, 菌落形成数), 培养终止时达 $1\sim 50\times 10^8$ CFU/mL. 然后从各培养物样本中, 抽取一定体积(如 0.05 或 0.08 mL 等)涂布于 LB 平板并喷洒足量 T1 噬菌体, 37℃ 培养 24 或 36 h 后, 计数每平板上的抗性菌落数. 抽样重复次数, 各样本不等(表 1). Luria-Delbrück 实验中的取样方式分 2 类(图 1), 这导致了统计学参数一样本数量 n 的生物学意义不同: A 组从同 1 个培养物(试管中的培养液)中重复取样, 共抽取了 n 次; B, C, D 组中分别从 n 个独立的培养物中各取样 1 次, 共 n 次.

重复抽样和不重复抽样是有限总体抽样中常考

表 1 Luria-Delbrück 波动试验的分组情况及实验数据汇总^{a)}

A 组			
样本编号	A-1	A-2	A-3
样本体积(mL)	10	10	10
抽样体积(mL)	0.5	0.5	0.5
抽样次数	10	10	10
抽样方式	从同 1 个培养管中重复抽取 n 次(图 1A)		
每次抽样在平板上得到的抗性菌落数 x_i	13	44	1
	13	46	2
	14	47	2
	14	48	2
	15	49	2
	15	51	4
	16	52	4
	20	56	4
	21	56	5
	26	65	7

续表 1

B 组					
样本编号	B-1	B-2	B-3	B-4	B-5
样本体积(mL)	10	10	10	10	10
抽样体积(mL)	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
抽样次数	9	8	10	10	5
抽样方式	从 n 个不同的独立培养管中各抽取 1 次(图 1B)				
每次抽样在平板上得到的抗性菌落数 x_i	3	7	10	5	13
	10	17	12	6	28
	10	17	23	6	35
	14	20	30	8	38
	17	29	40	10	107
	17	30	45	10	
	18	31	51	13	
	27	41	57	15	
	125		173	24	
			183	165	
C 组					
样本编号	C-1	C-2	C-3		
样本体积(mL)	0.2	0.2	0.2		
抽样体积(mL)	0.08	0.08	0.05		
抽样次数	20	12	19		
抽样方式	从 n 个不同的独立培养管中各抽取 1 次(图 1B)				
每次抽样在平板上得到的抗性菌落数 x_i	0	0	0		
	0	0	0		
	0	0	0		
	0	0	0		
	0	0	0		
	0	1	0		
	0	1	0		
	0	3	0		
	0	4	0		
	0	7	0		
	0	48	0		
	1	303	0		
	1		1		
	3		1		
	5		8		
	5		11		
	6		15		
	35		17		
	64		19		
	107				
D 组					
样本编号	D-1	D-2			
样本体积(mL)	0.2	0.2			
抽样体积(mL)	0.05	0.2			
抽样次数	100	87			
抽样方式	从 n 个不同的独立培养管中各抽取 1 次(图 1B)				
每次抽样在平板上得到的抗性菌落 x_i	0(57)	0(29)			
及次数	1(20)	1(17)			
	2(5)	2(4)			
	3(2)	3(3)			
	4(3)	4(3)			
	5(1)	5(2)			
	6~10(7)	6~10(5)			
	11~20(2)	11~20(6)			
	21~50(2)	21~50(7)			
	51~100(0)	51~100(5)			
	101~200(0)	101~200(2)			
	201~500(0)	201~500(4)			
	501~1000(1)	501~1000(0)			

a) 分组情况是作者根据 Luria 和 Delbrück 实验中样本大小、取样次数、取样方式不同而划分, 取样方式见图 1

考虑的两种抽样规则, 重复抽样得到的样本独立同分布, 是简单随机样本; 不重复抽样下的样本同分布但不独立, 因而不是简单随机样本. 不同抽样方式下样本均值的数学期望和方差公式应使用不同的计算方法.

区域实验重复次数的数量应遵循误差自由度等于或大于 10 的原则, 才能较正确地反映处理效应^[44]. 如果误差自由度小于 10, 常常造成处理间的本质差异暴露不出来, 即 F 值达不到显著水平. 原因是误差自由度偏小, 使误差方差相应增大; 而 F 值是处理方差与误差方差的比值, 这样 F 值就相应地缩小, 使之达不到 F 值的显著水准, 从而处理间的本质差异被掩盖. 而 Luria-Delbrück 实验的 A, B 组中都有观测值数目(n)小于 10 的样本.

1.2 假设 T1 对 *E. coli* B 为致死性因子, 从而排除了诱发突变发生的可能性

Luria-Delbrück 是基于噬菌体 T1 对 *E. coli* B 是致死性因子的假设来做出对实验结果的判断. 在足量 T1 作用下, 如接种菌群中无抗性细胞时则全部敏感细胞都会被侵染、裂解而死亡; 如存在抗性细胞时则能存活, 并能在平板培养过程中分裂扩增成为可见的菌落. 因此, 依据此假设, 只要有抗性菌落出现, 即可断定它必然已存在于接种液中. 依统计学观点, 这属于确定性结果^[45~51], 无论它属于何种概率分布类型, 都与突变方式(自发或诱发)无关. 因此, 对不同培养和抽样条件下形成的抗性菌落数的波动分析, 只能用以区分导致波动现象的原因是否源自实验过程本身的随机误差, 而不能成为排除“大肠杆菌在接触噬菌体后可能产生诱发突变”的依据.

微生物学、分子生物学的发展都表明: 除去高温、极强物理损伤等瞬间致死效应之外, 在选择性损伤条件下, 菌群的死亡动力学过程是由选择性因子的剂量和处理时间的复合作用决定的. 选择性因子对处于生长过程的菌群发生诱变作用的可能性是十分复杂的但不能被排除, 选择性损伤条件存在时残留下来的细胞其生理遗传特性与敏感菌的差别是十分复杂的, 不能以“全或无”来概括^[34~40]. 对细菌与噬菌体/药物相互作用的系列研究都表明, 细菌受到噬菌体(或药物)攻击的概率是噬菌体密度(或药物浓度)和作用时间的复合函数. 噬菌体的增殖力受到吸附率、溶源化率和潜伏期的影响, 也受到非生命因素如温度或细菌分布空间格局的影响^[28]. 由此可见, 接种

菌群在与 T1 混合后在 LB 平板上的培养过程中, 菌群被诱变的可能性不能被排除. 因为, 已存在于接种菌群中的抗性细胞, 涂布之后得以即时生长, 但因其被固定在 LB 平板表层, 其菌落数不随培养时间而增加, 涂布后培养 12~18 h 后成为可见的大菌落. 而在培养过程中, 在接触选择压力之后产生的抗性细胞形成的菌落, 发生时间远滞后于已存在于接种菌群中的抗性细胞(滞后时间约 18~24 h), 即涂布 30 h 后方可形成可见的小菌落, 随着培养时间延长这些菌落也会不断增大. 虽然 Luria 和 Delbrück^[2]以及 Newcombe^[3]也都观察到呈现在琼脂平板上的抗性菌落有大小不同, 半透明的小抗性菌落出现于培养后期, 但未追究其发生的机理. 本课题组在抗菌药物与细菌抗药性突变发生和扩增的关系研究中, 观察到抗性菌落大小不同, 小抗性菌落出现于培养后期的现象普遍存在^[34~43]. 通常认为 1 个细菌细胞经 23~24 次分裂扩增成约 1×10^7 个细胞时, 在 37℃ 约需 8~12 h, 始可发生 1 次自发性突变, 又经 8~12 h, 始可成为可见的菌落^[25,26]. 而已存在于接种液中的突变细胞则早已扩增成为大菌落. 所以培养后期大量小菌落的出现应为不能排除存在诱变效应的 1 个例证. 由此可知, 预培养过程中随机发生的自发突变细胞的增殖和累积效应, 确实能导致 Luria-Delbrück 观察到的抗性菌落数的波动, 但是不能成为认为菌群与 T1 接触后也只能出现自发突变的判据.

依据上述分析就能对在含有抗菌药物的平板上出现的菌落进行符合突变发生机理的统计分析. 剖析 Luria-Delbrück 波动试验进行统计分析出现的问题, 可为如何应用统计分析方法解决生物学问题提供启示, 因为统计分析仍然是得到生物学实验结果规律的重要依据.

1.3 Luria-Delbrück 统计分析中的局限性

均值和方差是描述样本总体统计特征的重要参数, 均值表征观察值的集中程度, 方差表征观察值的离散程度. 对正态分布数据, 均值($\bar{x} = \frac{\sum x_i}{n}$, 其中, x_i 为观察值, n 为观察次数)表征了观察值的中心点, 方差(Variance, S^2), $S^2 = \sum (x_i - \bar{x})^2 / (n-1)$, 则反映了样本中各观察值与平均值的差异程度, 是应用最广泛的描述离散程度的指标. χ^2 拟合优度检验主要应

用于检验某样本是否符合一个假设的分布. 方差均值比(σ^2/λ)或称为分散指数(偏离指数), 用于检验小样本资料($n \cdot \bar{x} < 30$)是否符合 Poisson 分布, 是基于 Pearson 提出的卡方(χ^2)统计量作为离散型随机变量非参数检验的一种方法. Poisson 分布的一个特征是: $S^2 = \bar{x}$ [45-51]. 通常假定 $\chi^2 = \sigma^2/\lambda \leq 1.0$ 服从 Poisson 分布, 而 $\sigma^2/\lambda > 1.0$ 则不服从 Poisson 分布. 而 Luria-Delbrück 应用的方差均值比 $S^2/\bar{x}$ 是基于大样本资料得到的统计量, 又把它当作分散指数法中 σ^2/λ 的无偏估计, 并根据其比值是否等于 1 而用于 Poisson 符合度的判断, 其检验结果只能说明波动试验中抗性细胞的分布不呈 Poisson 分布, 其最大可能性是实验设计本身的系统误差, 而不能将此作为判定选择压力下的突变是诱发还是自发突变的重要根据.

此外, Luria-Delbrück 在进行条件分析时, 以观测值的量值 Y_i 而不是量值的频数 y_i 来进行计算. χ^2 计算是以 Y_i 落在某个区间的频数 y_i 进行计算的 [45-51]: $\chi^2 = \sum (y_i - np_i)^2 / np_i$, 其中, p_i 是 y_i 的期望值, 表示某一性状出现的理论频数, 如以 Y_i 时, $\chi^2 = \sum (Y_i - \hat{Y}_i)^2 / \hat{Y}_i$, $\hat{Y}_i$ 为 Y_i 的期望值, 表示某一次实验结果取得某一性状量值的理论值. 所以两者统计学和生物学上的内涵都不相同, Y_i 方法不能用于区分概率分布类型 [50].

离散型随机变量方差的计算有多种方法, 比较复杂, 本文以二项式的分散指数代替理论频数的 Pearson 计算方法 [46], 由公式 $\chi^2 = (n-1)S^2/\sigma^2 = \sum (x_i - \bar{x})^2 / n \bar{x} \left(1 - \frac{\bar{x}}{n}\right) = \sum (x_i - \bar{x})^2 / \bar{x} \left(1 - \frac{\bar{x}}{n}\right)$ 导出 $\sigma^2 = \bar{x} \cdot (1 - \bar{x}/n)$. 若为 Poisson 分布, 则 $\sigma^2 = \lambda$. 对于小样本资料($n \cdot \bar{x} < 30$)可望给出离散型随机变量方差的近于无偏的估计.

表 2 异常值的检验(Grubbs 法)

A 组

样本	A-1	A-2	A-3
平均值 $\bar{x}$	16.7	51.4	3.3
样本方差 S^2	18.23	38.71	3.34
标准差 SD	4.27	6.22	1.83
高端异常值	无	无	无
最大检测值 $[G(n, \alpha = 0.05)]^{a)}$	26[26.99]	66[66.39]	7[7.71]
低端异常值	无	无	无

2 对 Luria-Delbrück 观察数据的重新统计分析

2.1 异常值的检验

异常值是单变量数据中的一个极值, 其明显偏离样本的其他数据项, 它的存在会严重扭曲统计值的结果 [52,53]. Luria-Delbrück 已预测并实际观察到了波动试验中存在着偏离样本的异常值的现象, 但在统计分析时对含有异常值的实验数据未作适当处理, 必然造成其统计结果存在失误.

在未知总体方差 σ^2 的情况下, 判断异常数据存在多种方法, 但计算都比较复杂, 而且多数不适用于样本容量小于 10 ($n < 10$) 的情况. 本文沿用 Grubbs 准则进行异常值的判别 [52].

依 Grubbs 准则, 上侧 Grubbs 数: $g_n = \frac{x_n - \bar{x}}{S}$, 下侧 Grubbs 数: $g_1 = \frac{\bar{x} - x_1}{S}$. 若 $g_n \geq G(n, \alpha = 0.01)$ 时为高端异常值, $g_1 \leq G(n, \alpha = 0.01)$ 为低端异常值 [51,52]. 据此, 对 Luria-Delbrück 波动试验中 4 组数据 13 个样本, 在 LB 平板上出现抗 T1 噬菌体菌落数(共含 310 个观察值)进行了异常值存在的检测, 结果表明多数样本都存在高端异常值(表 2). 高端异常值的存在会显著影响 $\bar{x}$ 和 S^2 的结果. 应为 Luria-Delbrück 数据会出现统计分析不确定性的原因之一. 但这一判断方法是有局限性的, 因此又应用了茎叶图方法再次进行异常值的分析.

2.2 样本同质性的检验——方差分析

A, B, C 和 D 4 组共 13 个样本, 各样本间 $\bar{x}$, SD 和 S^2 的结果却有不同(表 2). 方差分析结果表明(one-way analysis of variance) 4 组各样本间都表现为

续表 2

B 组					
样本	B-1	B-2	B-3	B-4	B-5
平均值 $\bar{x}$	26.78	24	62.4	26.2	44.2
样本方差 S^2	1400.94	114.57	3958.71	2410.18	1325.7
标准差 SD	37.43	10.70	62.92	49.09	36.41
高端异常值	有	无	无	有	有
最大检测值 $[G(n, \alpha = 0.01)]$	125[113.62]	41[47.75]	183[214.04]	165[144.51]	107[98.45]
低端异常值	无	无	无	无	无
C 组					
样本	C-1	C-2	C-3		
平均值 $\bar{x}$	11.35	30.58	3.79		
样本方差 S^2	752.13	7542.27	43.84		
标准差 SD	27.43	86.85	6.62		
高端异常值	有	有	无		
最大检测值 $[G(n, \alpha = 0.01)]$	107[93.64]	303[228.39]	19[23.45] ^{b)}		
低端异常值	无	无	无		
D 组					
样本	D-1	D-2			
每平板上的平均抗性菌落数 $\bar{x}$	10.1	28.6			
样本方差 S^2	6256	6432			
标准差 SD	79.1	80.2			
高端异常值	有	有			
最大检测值 $[G(n, \alpha = 0.01)]$	500~1000(1) 250	201~500(4) 300			
低端异常值	无	无			

a) 临界最大值 $G(n, \alpha = 0.01)$ 是根据临界值 g 计算得到, $G(n, \alpha = 0.05)$ 或 $G(n, \alpha = 0.01)$ 可查表得到. $g_n = \frac{X_i - \bar{x}}{Sd}$; b) C3 实验组为 $G(n, \alpha = 0.05)$

显著性差别(表 3). 去除高端异常值后方差分析仍表现为显著性差别. 为何由同一总体中抽样得到的观察值会表现为方差显著性差别? 是抽样随机失误或系统误差? 由于观察值都为 1 次抽样的结果, 不能应用剩余值法或技术 QQ 图来检测系统误差是否存在.

表 3 样本同质性的检验——方差分析(Bartlett's test)^{a)[54]}

样本	Bartlett's 统计量	P 值	方差是否存在显著性差异($P < 0.05$)
A-1	9.016	0.0110	是
B-1	26.58	<0.0001	是
C-1	65.50	<0.0001	是
D-1	16.88	0.0007	是

a) 以 A1, B1, C1 和 D1 样本为例, 其余样本类似(略)

2.3 对观测数据进行概率分布类型的检验

(1) 应用茎叶图分析技术对 A, B, C 和 D 4 组 13 个样本的观测数据概率分布类型的形象进行初步描绘^[44]. 对于数据分布, 常用直方图进行描述. 将数据取值的范围分成若干等间隔的区间这种直方图可以估计总体的概率密度. 组距对直方图的形态有很大影响, 组距太小, 每组的频数较少, 由于随机性的影响, 邻近区间上的频数可能很大; 组距太大, 直方图所反映概率密度的形态就不灵敏. 而在自由度小于 10 的条件下难以达到一个合适的分组. 茎叶图是一种分析未分组原始数据的统计图, 像是侧卧着的直方图. 如频率数峰值居中, 其他对称分布于两侧, 则表明为正态分布. 它既能给出数据的分布状况, 又保留着原始数据的个体信息, 是有效的探索性数据分析工具. 由表 4 可见, 除 B 组 4 样本外(自由度小于 10, 呈离散

表 4 应用茎叶图的数据分析技术的结果

样本 A-1		
茎(十位数)	茎(个位数)	频数
1	3, 3, 4, 4, 5, 5, 5	7
2	0, 1, 6	3
样本 A-2		
茎(十位数)	茎(个位数)	频数
4	4, 6, 7, 8, 9	5
5	1, 2, 6	4
6	1	1
样本 A-3		
茎(十位数)	茎(个位数)	频数
1	1	1
2	4, 2, 2, 2, 2	4
4	4, 4, 4	3
5	1	1
7	1	1
样本 B-1		
茎(十位数)	茎(个位数)	频数
0	3	1
1	0, 0, 4, 7, 7, 8	6
2	7	1
12	5	1
样本 B-2		
茎(十位数)	茎(个位数)	频数
0	7	1
1	7, 7	2
2	0, 9	2
3	0, 1	2
4	1	1
18	3	1
样本 B-3		
茎(十位数)	茎(个位数)	频数
1	0, 2	2
2	3	1
3	0	1
4	0, 5	2
5	1, 7	2
17	3	1
样本 B-4		
茎(十位数)	茎(个位数)	频数
0	5, 6, 6, 8	4
1	0, 0, 3, 5	4
2	4	1
16	5	1
样本 B-5		
茎(十位数)	茎(个位数)	频数
1	3	1
2	8	1
3	5, 8	2
10	7	1

样本 C-1		
茎(十位数)	茎(个位数)	频数
0	0(10), 1, 1, 2, 5, 6	15
3	5	1
6	4	1
10	7	1
样本 C-2		
茎(十位数)	茎(个位数)	频数
0	0(5), 1, 1, 3, 4, 7	10
4	8	1
30	3	1
样本 C-3		
茎(十位数)	茎(个位数)	频数
0	0(12), 1, 1, 8	15
1	1, 5, 7, 9	4
样本 D-1		
茎(十位数)	茎(个位数)	频数
0	0(57), 1(20), 2(5), 3(3), 4(3), 5, 6~10(7)	96
2	21~50(2),	2
10	1~20(1)	2
50	50~100(1)	1
样本 D-2		
茎(十位数)	茎(个位数)	频数
0	0(29), 1(17), 2(4), 3(3), 4(3), 5(2), 6~10(5)	63
1	11~20(6)	6
2	21~50(4),	4
5	51~100(5)	5
10	101~200(2)	2
20	201~500(4)	4

分布), A, B, C 和 D 组 9 个样本, 频率数峰值都集聚于茎叶图的高端(直方图左端), 显著不属于正态分布总体. 而且都有高端异常值的存在.

(2) Luria-Delbrück 实验数据不是来自 Poisson 样本的检验. 对来自一个总体中的系列数据进行离散型变量概率分布类型的检验已有多种方法^[44~50], 但是对来自不同总体中的数据进行检验则至为复杂, 如 Luria-Delbrück 的 5 组数据, 因受限于抽样数少(如 A, B, C 组); 或存在多个“0”值(如 D-1, D-2 组); 或存在高端异常值等. 抽样随机误差等众多不确定性因素的影响, 进行适合性检验时, 只能经验性地给出组距划分, 各组结果不符合具备同等可能性始可进行比较的条件, 以 χ^2 为判据进行离散型概率分布类型判别时至为复杂.

χ^2 的计算方法很多, 根据分布类型由 χ^2 值而定, 但计算过程都比较复杂, $\chi^2 = \sum (O_i - T_i)^2 / T_i$ ^[47]. O_i

观察频数, T_i 理论频数, $T_i = P_i \cdot \sum O_i$, 其中, P_i 为理论分布概率的期望值. 如 Poisson 分布的检验, 其理论概率的期望值 ($P_{(k)}$) 的计算公式为: $P_{(k)} = \frac{\lambda^k \cdot e^{-\lambda}}{k!}$.

通常情况下, χ^2 随数据分组的组距减少而增加; 当抽样数 < 30 时, 为达到期望频数 ≤ 5 的要求, 往往需要合并相邻的组, 从而减少分组数; χ^2 值的判断因分组数的自由度不同而异, 准确判断比较困难.

Luria-Delbrück 的 4 组数据显示上述多种不确定性影响因素都存在, 必然会产生高的错误率. 试用上述方法对 A, B, C 和 D 组数据进行概率类型检验时, χ^2 值的差别很大, 改变组距又呈现不同甚至相反的结果. 作为系统误差又不能任意删除异常值, 为解决此难题本研究试用相对概率分布直方图的方法, 得到频率分布图, 以对数据的分布趋势进行直观的了解, 然后根据由 $\ln(p_i \cdot x!)$ 对 $X!$ 作图, 由 3 点分布为直线、向上弯曲、向下弯曲判定其为 Poisson 分布、负二项分布(聚集分布)、或二项分布^[54,55]. 它的依据为: 由概率论知识知, 若随机变量 $\zeta \sim P(\lambda)$, 则

$P(\zeta = X) = \frac{e^{-\lambda} \lambda^X}{X!}$, $X = 0, 1, 2, \dots$, $\lambda > 0$. 若假设数据来自参数为 λ 的 Poisson 总体, 则在 n 次实验中 ζ 取值为 X 的理论频数为: $np_i = n \cdot \frac{e^{-\lambda} \lambda^X}{X!}$. 即: $\ln(np_i) = \ln n + x \ln \lambda - \ln x! - \lambda$. 亦得: $\ln(p_i \cdot x!) = -\lambda + x \ln \lambda$.

所以点 $(X, \ln(p_i \cdot x!))$ 在斜率为 $\ln \lambda$, 截距为 $-\lambda$ 的直线上. 由于实测频数围绕理论频数波动, 故散点 $(X, \ln(p_i \cdot x!))$ 中的点应该散布在理论直线上及其附近. 这样, 我们就可以得到一张用来判断数据是否来自 Poisson 分布的图形——Poisson 图. 当 Poisson 图明显呈一直线时, 表明数据来自 Poisson 总体, 可用 $\bar{X} = \frac{1}{n} \sum n_i x$ 估计 λ .

否则可对一些远离理论直线的孤立点进行剔除, 再拟合一条直线, 并用其斜率 b 估计 λ , 即由 $\ln \hat{\lambda} = b$ 得 $\hat{\lambda} = e^b$. 若 Poisson 图明显地呈弯曲形状, 表明数据不是来自 Poisson 总体.

应用这 2 种方法对文献[45~50]中一些典型数据进行拟合时都得到了一致的结果(略), 图 2 和 3 为对 Luria-Delbrück 实验中 A, B, C, D-1 和 D-2 共 5 组数据进行拟合的结果. 由图 2 相对频数直方图可见, χ^2

值都集中于左测, 整体分布呈左倾斜, 是典型的 χ^2 概率分布类型.

由 $\ln(x! p_i)$ 对 x_i 作图(图 3), 其散点连成线都呈向上偏曲, σ^2 / x 都 > 1.0, 可拟合二次指数函数, 符合负二项(聚集)分布概型, 而不是线性函数(Poisson)分布.

负二项分布与 Poisson 分布的区别是: 总体中个体呈现概率是不相同的, 即变化规律服从负二项展开式; 指数 k 为表征聚集程度的参数, k 愈小聚集程度愈大, 从而使方差偏大; 而 Poisson 分布中方差与均值相等.

(3) Luria-Delbrück 实验数据符合聚集分布的检验. 聚集分布是一种负二项分布, 是生态学中常用的分布类型. 聚集度是重要的空间分析指标, 在描述生物种群随机分布的概率模型中, 已提出了多个聚集度指标^[53~55]. 以下选择 2 种模型:

Lloyd 的平均拥挤度模型: $m' = \frac{m + S^2}{m - 1}$. 其中, m' 为平均拥挤度指数, m 为均值, S^2 为方差. 聚集度指标 $\frac{m'}{m} > 1.0$, 则为聚集分布.

矩法测定聚集度 k : $k = \bar{x}^2 / (S^2 - \bar{x})$, $\bar{x} = 1 / x \sum f_i \cdot i$, $S^2 = \sum f_i \cdot i(i - \bar{x})^2 / (N - 1)$. 其中, i 为观测值的量值, f_i 为 i 的频数, N 为总频数.

检验结果表明(表 5, 表 6), A, B, C, D-1, D-2 共 5 组都呈聚集分布, 彼此的差别只是聚集度 k 值的不同. 由此看来, Luria-Delbrück 以是否符合 Poisson 分布为判据对 5 组数据进行概型的区分存在偏颇.

3 出现聚集分布原因的探讨

微生物学和遗传学的实验表明, 细菌的自发和诱发突变都是小概率事件. 通常一个敏感细胞分裂至约 1×10^7 细胞时, 才可能发生一次自发性随机突变的机会. 在培养液内, 产生的突变细胞存在于上百万个敏感细胞群的空间之中. Luria-Delbrück 的实验数据表明^[2], 平均突变率为 2.45×10^{-8} 细胞⁻¹ 分裂⁻¹, 即当培养物中敏感菌细胞达 $1 \times 10^8 \sim 5 \times 10^9$ / mL 时, 始可检出自发突变的细胞形成的菌落, 意味着每 1 个突变细胞的周围都存在数以亿计的敏感细胞群, 敏感细胞在空间上密集排列, 必然产生位阻效应、竞争效应等空间作用, 使突变细胞难以成为离散状态随机自

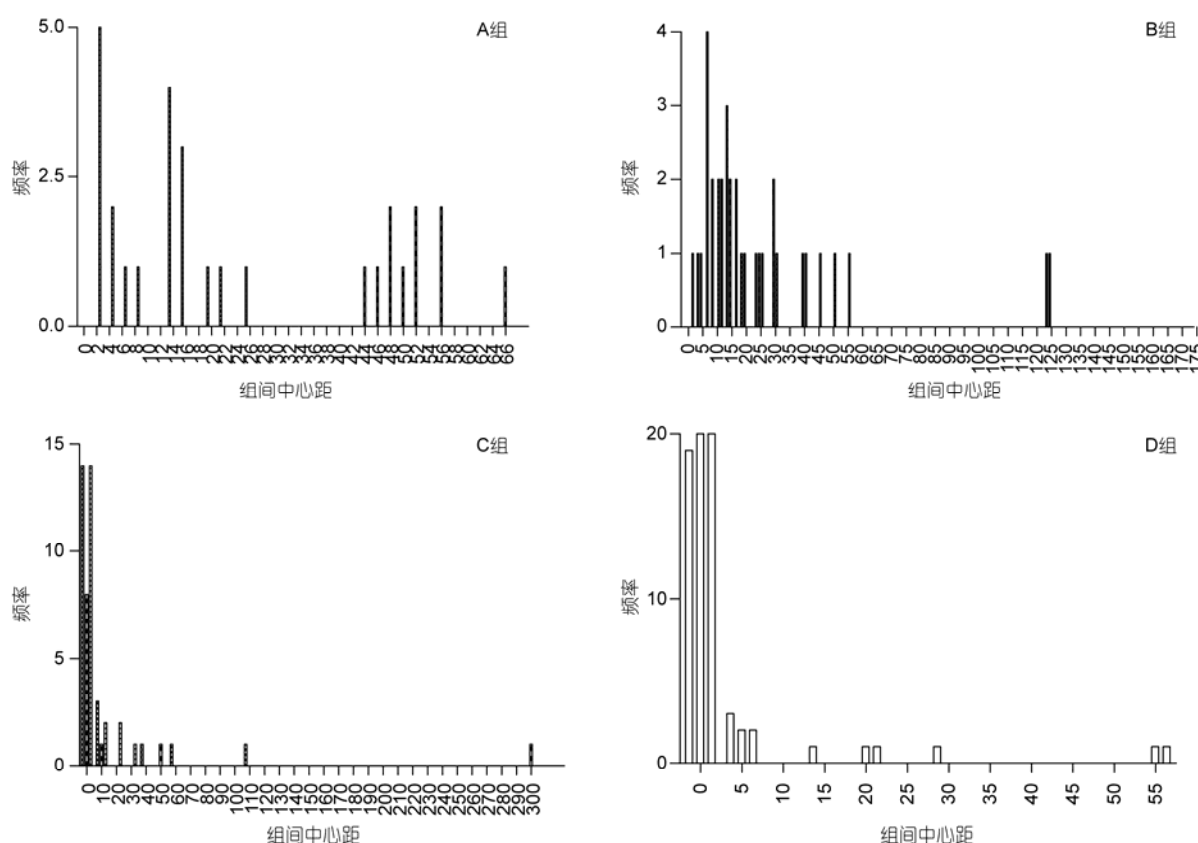


图 2 频率分布直方图

由扩散, 必然趋向聚集分布. 由此, 可能加剧了抽样均匀化程度对平板上抗性菌落数的波动程度. 实验中抽取 0.5 或 0.02 mL 含有突变细胞的培养液涂布于 LB 琼脂平板表面时, 因菌液中的细胞都被固定在琼脂表面, 最终出现的 1 个抗性菌落可由最初离散的单个抗性细胞或聚集在一起的多个抗性细胞(细胞簇)形成. 因此, 平板上可观察到的突变菌落数还取决于涂布方法对抽样样品的均匀化程度. 这一操作细节对以聚集分布程度不同的存在于敏感细胞中的抗性细胞则可能会产生显著影响.

Newcombe 的重涂布实验则清楚地表明(表 7): 抗噬菌体突变菌落会随着对抗性菌落的重新涂布而显著增加^[3]. 实验用特制的接种器把菌液多点接种(定点接种)在 LB 琼脂平板表面, 培养 3, 4, 5 和 6 h 之后把接种点给以均匀涂布使其扩散, 再加入噬菌体, 继续培养至 24 h 后, 观察抗性菌落形成数. 表 7 可见, 不经重涂布的接种点中抗性菌落数呈指数性扩增方式, 由 4 至 6 小时增大了 30 倍(40/1.3). 经重涂布的接种点则呈 Bottzman-Sagmoid 扩增方式, 由 4~6 h 增

大了 1624 倍(2160/1.33). Newcombe 认为这一结果证实了 Luria-Delbrück 抗 T1 噬菌体突变株的发生与 T1 噬菌体的存在无关的推断. 但 Newcombe 对经或不经重涂布的接种点抗性菌落数的扩增结果为何有这样大的差别未作解释. 此后, 引用这一结果的研究者也都忽略了这一现象. 本研究分析, 这恰好证实了 T1 噬菌体具诱发抗噬菌体突变株发生的作用, 是突变表型滞后表达的特征. 这是因为存在于接种点中的大量的敏感细胞, 因受噬菌体诱导可产生更多的, 远大于自发突变细胞的抗性细胞, 并随培养时间而扩增; 但是也都被固定在 LB 琼脂平板表面, 限定(聚集)在定点接种时形成的菌落中. 重涂布使聚集在整个平板表面菌落中的大量的抗性细胞分散开, 出现了重涂布时可增加 1624 倍的结果. 如果, 重涂布效应形成的抗性菌落仅来自接种点中的抗性细胞, 只能表现为指数性增加 40 倍, 并不可能出现重涂布时增加了 1624 倍的结果.

Luria-Delbrück 期望由 A, B, C 和 D 组应用差别 10~100 倍的预培养接种量, 以造成抗性菌落数方差

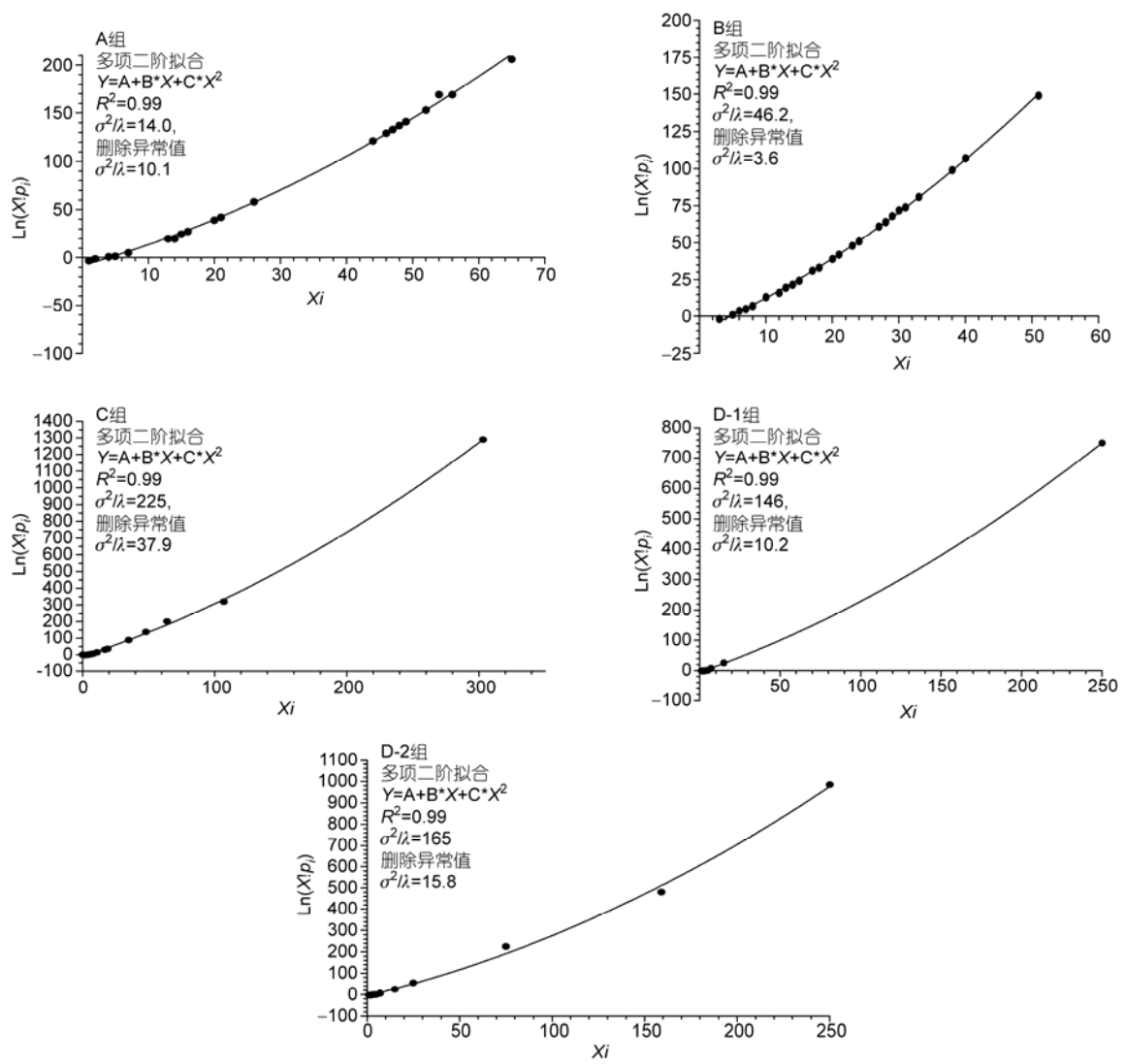


图 3 $\ln(x!p_i)$ vs X_i 图, 用以区分离散型变量的概率分布类型

表 5 矩法测定聚集指数 k

实验组	A	B	C	D1	D2
$\bar{x}$	2.5	1.7	2.6	9.9	7.5
S^2	37.4	27.0	47.0	30.6	69.6
$S^2 / \bar{x}$	14.9	15.6	7.7	3.1	9.3
k	0.18	0.11	0.16	0.36	0.91

均值比 $S^2 / \bar{x}$ 的悬殊差别; 进而以此为据, 证实抗 T1 噬菌体突变株的发生与 T1 噬菌体的存在无关的推断. 对此, 以上已经给出了详尽的分析. 现由细菌菌群生长的动力学过程, 分析差别 10~100 倍的接种量, 对自发突变株的影响. 图 4 是菌株 *E. coli* CVCC249 以 1×10^5 , 1×10^4 , 2×10^2 CFU/mL, 接种于含 5 L LB 液

表 6 聚集分布检验(Lloyd 平均拥挤度模型)

	m	S^2	m'	m'/m 及其均值
A1	16.5	5.9	16.9	1.02
A2	50.6	15.0	50.9	1.01
A3	3.37	0.71	3.67	1.1
B1	26.8	24.5	36.9	1.35
B2	22.5	107	27.5	1.22
B3	52.1	580	63.1	1.21
B4	26.2	200	34.1	1.30
B5	44.2	468	45.1	1.02
C1	11.1	618	72.1	6.5
C2	31	4529	181.6	5.86
C3	4.3	51	19.7	4.59
D1	9.7	813	102.8	10.6
D2	28.6	810	60.1	2.1

体培养基的 7 L 发酵罐中, 37℃条件下培养的生长的动力学曲线(12 h 前每间隔 1 h, 12 h 后每间隔 2 h 取样). 样品测试至少为 3 次重复, 变异系数 CV (coefficient of variation) 小于 5%^[35]. 动力学曲线近似为分批培养下的 Sigmoid 双曲线形迹. 应用 Boltzman-Sigmoid equation, 可适合, $R^2=0.98$. 1×10^5 个细胞/mL 的接种量, 菌群在 3.5 h 即可达 1×10^7 即具备发生自发突变的可能性. 而 1×10^4 , 2×10^2 个细胞/mL 的接种量则需延迟至 15 和 24 h,

始可具备发生自发突变的可能性. 在 24/32 h 取样时, 1×10^5 CFU/mL 组的培养液中突变细胞数高于另外 2 组. 不同取样量进一步扩大了差别. Luria-Delbrück 也观察到, 大的突变菌落 12 h 即可出现, 而小的菌落则在 24~28 h 后始可被观察到^[2]. 结合图 4 的结果, 本文认为它表明大菌落应来源于预培养过程中的自发突变, 而迟发的小菌落应为在倾注到平板上在噬菌体存在下形成的, 所以不能排除发生诱发的可能性.

表 7 Newcombe 重涂布实验结果分析

平板上的抗性菌落数(x_i)								
重涂布前的培养时间(h)	3		4		5		6	
起始时细胞数(个)	5.1×10^4		5.1×10^4		5.1×10^4		5.1×10^4	
终止时细胞数(个)	1.7×10^6		2.3×10^7		2.6×10^8		2.8×10^9	
细菌增殖倍数	33		480		5100		54900	
平板号	Unsp	Sp	Unsp	Sp	Unsp	Sp	Unsp	Sp
1	0	0	0	0	5	194	46	2254
2	0	0	3	0	3	14	25	1434
3	0	1	0	6	4	16	45	3294
4	0	0	2	0	8	13	49	3719
5	0	0	1	0	2	4	26	1538
6	0	1	2	2	6	112	49	399
$\sum x_i$	0	2	8	8	28	353	240	12638
$\bar{x}$	0	0.33	1.33	1.33	4.67	58.83	40	2106.3
SD	0	0.52	1.21	2.42	2.16	77.52	11.35	1242.83
S^2	0	0.27	1.47	5.87	4.67	6009.8	128.8	1544615
$S^2 / \bar{x}$	—	0.8	1.1	4.4	1	102.15	3.22	733.32

Unsp: 未重新涂布; Sp:重新涂布

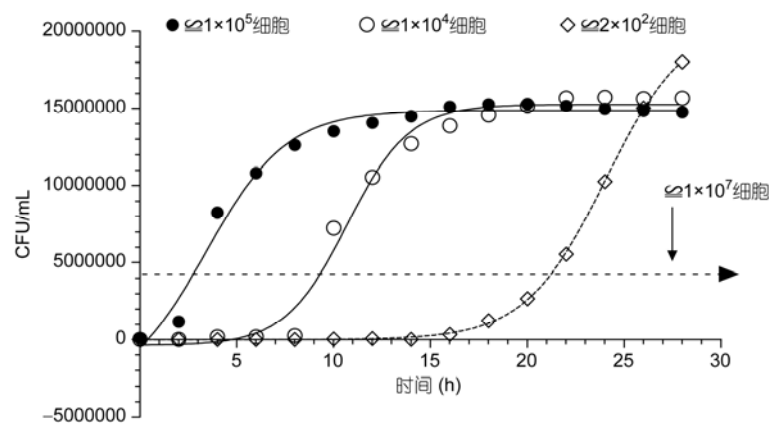


图 4 大肠杆菌生长动力学曲线(37℃)
Boltzmann-sigmoid 方程拟合, $R^2=0.98$

4 讨论

4.1 Luria-Delbrück 波动试验中液体培养物中的突变细胞数不呈 Poisson 分布

Luria-Delbrück 波动试验中液体培养物中的抗性突变细胞, 有 2 种来源: 其一是新发生的突变事件所产生的突变细胞; 其二是前期发生的突变事件所产生的突变细胞经过分裂后产生的突变细胞后代. 若突变细胞只来源于第一种原因(即突变事件的发生), 则突变细胞的数量能够代表突变事件发生的多寡, 突变细胞数应该服从 Poisson 分布. 这是众多生物数学专家的共识^[45,46,56-60]. Cairns 等人^[6]1988 年发表的适应性突变的经典实验(以乳糖为唯一碳源的固体平板上 $\text{lacZ}^- \rightarrow \text{lacZ}^+$), 因为固体平板上 1 次突变事件只导致 1 个突变菌落的出现, 因此, Cairns 实验中回复突变菌落来自突变事件, 是 Poisson 变量, 检验结果也符合 Poisson 分布, 与 Luria-Delbrück 分布完全不同. 事实上, 液体培养物中突变细胞产生的第二种原因也同时存在, 导致 Luria-Delbrück 波动试验中的液体培养物中突变细胞数, 既对前期已经发生的突变具依赖性, 还具有时间依赖性: 表现在前期突变发生的时间与涂布时间之间的时间间隔越长, 已经存在的突变细胞通过细胞分裂产生的子代突变细胞的数量就越多. 统计学上定义“Poisson 事件为偶然事件, 与已存在量和时间过程无关”^[46]. Poisson 分布是用于描述离散型随机事件(变量)概率分布的一种统计规律, “这一随机事件在特定时刻的发生与否既独立于时间, 也独立于已经发生的次数”^[61]. 因此, 液体培养物中突变细胞数目不符合 Poisson 分布. 更不能利用两种不同模式(图 1)得到的突变细胞数的分布是否符合 Poisson 分布, 作为区分突变是自发产生还是诱发产生的判据. 这应验了统计学家陈希孺在“机会的数学”一书中的观点“统计规律未必蕴含因果关系, 寻找因果关系应是各专门学科的任务”^[62].

4.2 Luria-Delbrück 波动试验中所检测的突变菌落, 不能排除接触致死性选择因子(噬菌体 T1)后发生诱发突变的可能性

在非选择条件下, 自发性突变只能以小概率发生. 限定为发生某一抗性突变的概率应为更稀少事件. 波动试验中涂布前的预培养使自发突变细胞有

了不同程度的扩增, 接种于含有过量选择性因子(如 T1 噬菌体)的条件下, 敏感细胞生长受抑制或被致死是一个时间过程, 而且菌群对选择性因子的敏感程度并非均匀一致. 因此, 发生诱发突变的可能性应是存在的. 所以, 最终在培养平板上出现的抗性菌落, 应为涂布前预培养过程中产生的自发突变和接触选择压力后发生的诱发突变的共同结果. 突变细胞聚集分布和“大/小”菌落的存在都是这一机制的反映. 诚然, 接触噬菌体 T1 后发生诱发突变的可能性的存在, 与 Luria-Delbrück 提出的“在接触之前可以发生自发突变”的观点并无矛盾.

4.3 对 Luria-Delbrück 的波动试验与数理统计分析的认识

Luria-Delbrück 也观察到大小菌落在不同培养时期出现这一现象, 并且指出 2 类大小不同的突变菌落的其他性质极为接近. 刘玉庆等人^[36,41]报道了大肠杆菌在抗生素恩诺沙星存在的平板上出现的大小不同的抗性菌落, 其基因型变化没有显著性差异. Jin 等人^[64]报道了大肠杆菌的 *leuB*⁻缺陷突变株, 在亮氨酸饥饿的选择培养条件下和非选择培养条件下, 其 *leuB*⁺回复子的基因型都存在 3 种类型, 且 3 种类型的比例接近. 因此, 仅仅依据突变菌落的概率分布不能成为判定突变发生机制的唯一依据——是来源于自发突变或诱发突变, 它还取决于微生物学的检验技术的准确度.

抽样误差和涂布均匀度对数据准确度的影响被忽视, 导致计算细菌突变率时得到不同的结果. 如 Luria-Delbrück 的 A 组采用对样品重复抽样方法, 总抽样量接近样本体积的 1/2, 这样计数的突变细胞的数量(不计聚集分布影响的话), 则为 10 次抽样的均值, 其结果应近于真值. 但 B、C 和 D 组的抽样方法是随机抽取样本体积的 1/10~1/20, 计数的突变细胞是 1 次, 误差必然有随机性, 所以 C、D-1 和 D-2 组都出现大量“零”值, 又出现高端异常值. 由于忽略抽样误差和聚集分布 2 类因素的影响, 使观察值具不同程度的不确定性, 各组数据间难以在“随机, 均匀”条件下进行统计分析. 同时, 由于突变细胞在培养液的抽样中趋向聚集分布, 因此涂布均匀度会显著影响选择平板上的抗性菌落数, 对此, 未应用标准化的操作方法以减少其影响, 这也是以平板上菌落数为据计算突变率时遇到的问题.

导致 Luria-Delbrück 波动试验数据中存在高端异常值出现的原因, 可能在于: 细菌细胞在分裂和增值过程中的聚集, 前一突变持续产生突变子代细胞导致对前一突变的依赖性和时间依赖性. 统计学中已经证明, 对于 Poisson 分布, 算术平均值可以作为期望值的无偏估计; 利用其与方差的比值可以作为是否服从 Poisson 分布的判据. 前面已经指出, 在 Luria-Delbrück 的波动试验中, 其统计量(液体培养物中的突变细胞数)并不服从 Poisson 分布, 且存在高端异常值, 简单地以算术平均值作为期望值必然会出现极大偏差.

检验结果显示 Luria-Delbrück 波动试验中的突变细胞呈聚集分布, 这与刘实^[25]观察到大肠杆菌分裂后细胞的不分离现象相吻合, 分裂后细胞的不分离可能是聚集分布的成因之一. 此外, 采用重复抽样和不重复抽样二类方法, 使各实验组间均值方差的比值也不具等价可比性.

4.4 关于细菌耐药/抗药性

一种药物对细胞的作用, 可能为非选择性的致死性杀伤, 也可能为对一基因特异性靶点的致突变作用, 也可能对多个靶点具致突变作用. 不同作用条件下, 也会导致细菌细胞的生理状态改变, DNA 复制能力、复制过程中的保真性以及 DNA 损伤修复功能发

生改变(如 SOS 反应等), 从而提高了细菌的自发突变率, 进而各种突变都可能以较高的频率发生^[56~60,63]. 但是, 不能以此为根据, 反推出“细菌在接触选择条件前可以发生自发突变”的结论.

5 结论

60 多年来对 Luria-Delbrück 推断的众多的争议中, 从生物学角度缺少对细菌抗性突变株的发生和扩增与相应的选择性损伤条件的因果关系进行分析, 而是集中于不同的概率分析方法对突变率的估算. 由微生物学生长动力学过程来看, 在未能瞬时测定菌群生长和突变发生时, 对突变率的准确估算难以解决^[9,25~29,34~39], 实际上众多研究者得到的只是基于总体菌落数推断的突变频率, 而不是特异性的突变发生的真值. 关于适应性突变的争论也近 20 年, 由于涉及 SOS 应答等至为复杂的调控机理, 至今仍未定论^[58,63]. 突变发生在个体水平上, 但其表达是在增殖过程中, 这是一个随时间变化的动力学过程, 是过程函数. 而菌落在平板上的出现是一终点值, 为状态函数. 抗性突变株发挥作用也是基于其大量增殖形成的群体; 这表明对其增殖动力学瞬变过程的研究, 应为解决这一难题的关键点.

致谢 感谢陈力行教授、徐明瑜教授(山东大学数学与系统科学学院)和刘垂珏教授(美国加州大学统计学系)多年来对研究工作的指导.

参考文献

- 1 薛京伦. 表观遗传学. 上海: 上海科技出版社, 2006
- 2 Luria S E, Delbrück M. Mutations of bacteria from virus sensitivity to virus resistance. *Genetics*, 1943, 28: 491-511
- 3 Newcombe H B. Origin of bacterial variants. *Nature*, 1949, 164: 150-151
- 4 Lederberg J, Lenderberg E M. Replica plating and indirect selection of bacteria mutants. *J Bacteriol*, 1952, 63: 399-405
- 5 Demerce M. Origin of bacterial resistance to antibiotics. *J Bacteriol*, 1948, 56: 63-74
- 6 Cairns J, Overbaugh J, Miller S. The origin of mutants. *Nature*, 1988, 335: 142-145
- 7 Foster P L. Are adaptive mutations due to a decline in mismatch repair? The evidence is lacking. *Mutat Res*, 1999, 436: 179-184
- 8 Crump K S, Hoel D G. Mathematical models for estimating mutation rates in cell populations. *Biometrika*, 1974, 61: 237-237
- 9 刘垂珏. 微生物突变率的估计. *中国科学 B*, 1983, 7: 625-633
- 10 Tlsty T D, Margolin B H, Lum K. Differences in the rates of gene amplification in nontumorigenic and tumorigenic cell lines as measured by Luria-Delbrück fluctuation analysis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86: 9441-9445
- 11 Sahotra S. Haldane's solution of the Luria-Delbrück distribution. *Genetics*, 1991, 1217: 257-261
- 12 Jones M E, Thomas S M, Rogers A. Luria-Delbrück fluctuation experiments: Design and analysis. *Genetics*, 1994, 136: 1209-1216
- 13 Stewart F M. Fluctuation tests: How reliable are the estimates of mutation rates? *Genetics*, 1994, 137: 1139-1146

- 14 Rosche W A, Foster P L. Determining mutation rates in bacterial population. *Methods*, 2000, 20: 4–17
- 15 Kepler T B. Improved inference of mutation rates: I. an integral representation for the Luria-Delbrück distribution. *Theor Popul Biol*, 2001, 59: 41–48
- 16 Angerer W P. An explicit representation of the Luria-Delbrück distribution. *Math Biol*, 2001, 42: 145–174
- 17 Zheng Q. Statistical and algorithmic methods for fluctuation analysis with SALVADOR as an implementation. *Math Biol*, 2002, 176: 237–252
- 18 Zheng Q. New algorithms for Luria-Delbrück fluctuation analysis. *Math Biol*, 2005, 196: 198–214
- 19 Zheng Q. On Haldane's formulation of Luria and Delbrück's mutational model. *Math Biosci*, 2007, 209: 237–252
- 20 Dewanji A, Luebeck E G, Moolgavkar S H. A generalized Luria-Delbrück model. *Math Biosci*, 2005, 197: 140–152
- 21 Zheng Q. On Haldane's formulation of Luria and Delbrück's mutation model. *Math Biosci*, 2007, 209: 500–513
- 22 Hall B M, Ma C X, Liang P, et al. Fluctuation analysis calculator: A web tool for the determination of mutation rate using Luria-Delbrück fluctuation analysis. *Bioinformatics*, 2009, 25: 1564–1565
- 23 Wax R G, Lewis K, Salyers A A, et al. *Bacterial Resistance to Antimicrobials*. 2nd ed. New York: CRC Press, 2007
- 24 Mortelmans K, Zeiger E. The Ames Salmonella/microsome mutagenicity assay. *Mutat Res*, 2000, 455: 29–60
- 25 刘实. 液体培养基内跟踪细菌生长和一个新的细菌生命模式. *中国科学 C 辑: 生命科学*, 1999, 29: 571–579
- 26 Ferenci T. Growth of bacterial cultures 50 years on: Towards an uncertainty principle instead of constants in bacterial growth kinetics. *Res Microbiol*, 1999, 150: 431–443
- 27 Thattai M, Oudenaarden A. Stochastic gene expression in fluctuation experiments. *Genetics*, 2004, 167: 523–530
- 28 Waldor M K, Friedman D L, Adhya S L. *Phages: Their Role in Bacterial Pathogenesis and Biotechnology*. Washington: ASM press, 2005
- 29 Mantzaris N V. Stochastic and deterministic simulations of heterogeneous cell population dynamics. *J Theor Biol*, 2006, 241: 690–706
- 30 Wax R G, Levis K, Salyers A A, et al. *Bacterial Resistance to Antibiotics*. 2nd ed. New York: CRC press, 2008
- 31 Kohanski M A, Owyer D J, Hayeto B, et al. A common mechanism of cellular death induced by bactericidal antibiotics. *Cell*, 2007, 130: 797–810
- 32 Trindade S, Perfiito L, Gordo I. Rate and effects of spontaneous mutations that affect fitness in mutator *E. coli*. *Phil Trans R Soc B*, 2010, 365: 1177–1186
- 33 陈玲玲, 彭贵子, 张伟丽, 等. 突变在基因组进化中的意义. *遗传*, 2006, 28: 631–638
- 34 Liu Y Q, Zhang Y Z, Sun C Y, et al. A novel approach to estimate *in vitro* antibacterial potency of Chinese medicine using a concentration-killing curve method. *Am J Chin Med*, 2005, 33: 671–682
- 35 张怀强, 刘玉庆, 刘波, 等. 分批培养条件下细菌群体生长阶段的区分及生长参数的确定. *中国科学 C 辑: 生命科学*, 2005, 35: 1–11
- 36 刘玉庆, 张怀强, 沈建忠, 等. 大肠杆菌群体的生理异质性和药敏实验的影响. *中国科学 C 辑: 生命科学*, 2007, 37: 524–529
- 37 张怀强, 卢丽丽, 阎雪岚, 等. 细菌群体异质性和生长动态过程的影响及其表征. *中国科学 C 辑: 生命科学*, 2007, 37: 246–256
- 38 刘波, 金建玲, 张辉, 等. Ames 测试不确定性分析. *应用与环境生物学报*, 2007, 13: 726–730
- 39 金建玲, 杨维强, 张辉, 等. 突变率计算中细菌群体生长不同步系数的修正. *微生物学通报*, 2009, 36: 0446–0452
- 40 张怀强, 赵越, 何秀丽, 等. 构建大肠杆菌药敏实验新方法的探索. *中国科学 C 辑: 生命科学*, 2010, 40: 75–85
- 41 刘玉庆, 张怀强, 胡明, 等. 药敏实验方法的局限性及改进的建议. *山东大学学报(医学版)*, 2011, 49: 124–132
- 42 金建玲, 张为灿, 李瑜, 等. 大豆过氧化物酶-过氧化氢-碘化钾体系的杀菌作用. *微生物学报*, 2011, 51: 393–401
- 43 Zhang Z, Huang J, Wang Z F, et al. Impact of Indels on the Flanking Regions in Structural Domains. *Mol Biol Evol*, 2011, 28: 291–301
- 44 Bliss C I, Fisher R A. Fitting the negative distribution to biological data. *Biometrics*, 1953, 9: 176–200
- 45 杨纪柯, 乔翔林, 陈霖. *生物数学概率*. 北京: 科学出版社, 1982. 392–399
- 46 马育华. *实验统计*. 北京: 农业出版社, 1982. 446
- 47 李惕碚. *实验的数学处理*. 北京: 科学出版社, 1983
- 48 范金城, 梅长林. *数据分析*. 北京: 科学出版社, 2002
- 49 方开泰, 许建伦. *统计分布*. 北京: 科学出版社, 1987. 289
- 50 唐启义, 王磊, 胡国义. 回归模型分析中卡方(X^2)检验的误用. *昆虫知识*, 1997, 34: 353–354
- 51 Gerry P Q, Keough M J. *生物实验设计与数据分析*. 蒋志刚, 李春旺, 曾岩, 译. 北京: 高等教育出版社, 2003
- 52 Grubbs F E. Sample criteria for testing out typing observations. *Ann Math statistics*, 1950, 21: 27–58
- 53 Dixon W J. Analysis of extreme values. *Ann Math Statistics*, 1950, 21: 488–506
- 54 刘延令, 丁道茅. 几种离散分布的判定问题. *中国卫生统计*, 1989, 6: 14–17
- 55 范金城, 梅长林. *数据分析*. 北京: 科学出版社, 2002. 12–17

- 56 吕忠, 王敖全. 研究适应突变的一个新的实验系统. 中国科学 C 辑: 生命科学, 2000, 30: 547–553
- 57 Miller J H. Spontaneous mutation in bacteria: Insights into pathways and repair. Annu Rev Microbiol, 1996, 50: 625–643
- 58 Lewis R W, Taber A.S. Bacterial resistance to antimicrobials. 2nd ed. New York: CRC Press/Taylor and Francis Group, 2008
- 59 金建玲, 高培基. 选择条件下细菌突变的研究. 自然, 2002, 27: 320–323
- 60 Gregory J M, Reuben S H, Petter L L, et al. The SOS response regulates adaptive mutation. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97: 6646–6651
- 61 Chiang Chin-Long, Poisson process: In An Intruduction to Stochastic Processes and their Applications. New York: Robert E. Krieger Publishing Co., 1980. 184–186
- 62 陈希孺. 机会的数学. 北京: 清华大学出版社, 2000
- 63 Jin J L, Gao P J, Mao Y M. Occurrence of *leu*⁺ revertants under starvation cultures in *Escherichia coli* is growth-dependent. BMC Genetics, 2002, 3: 6