

进展与评述

微生物诱变突变率的估计

刘 垂 珩

(安徽农学院)

突变率是基本遗传量之一。估计突变率,不仅在理论上具有重大的价值,对于微生物诱变育种,更是具有指导意义。

对突变率的估计,一般是观察菌落形态变异,或采用特殊的培养方法,例如用限制营养法来估计营养缺陷型的突变率。

微生物在经济上的被利用,总是体现于目标产物(抗生素、氨基酸、酶、维生素、有机酸或有机溶剂等)的产量。微生物诱变育种的目的,就是通过诱变处理,以获得稳定的正变株。

基于微生物诱变育种工作的随机性,可以运用数理统计方法来估计突变率。这方面的理论分析,笔者已在[2]中阐明,本文谨对具体方法加以介绍。

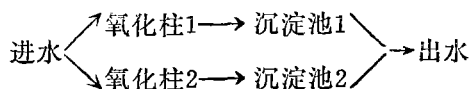
一个菌株的子代目标产物产量的分布,叫做这个菌株的产量分布^[1,2],根据微效多基因学说,一般菌株的产量分布应当是正态的,并为广泛的实践所证实^[2]。

用充分多的出发菌株的子代个体作诱变

处理时,被处理的子代将分化为三个部分:有相当大一部分子代个体在诱变处理过程中被杀死,没有被杀死的子代个体中的一部分没有发生突变,保持着出发菌株的特性而残存下来,其它子代个体则发生了突变。用诱变处理后存活的个体所作出的产量分布,称为诱变分布。诱变分布实际上是残存部分的分布与突变部分的分布两者的混合分布。

显然,残存部分的分布应当与出发菌株的产量分布一致,因而,这是我们在诱变处理之前就可以掌握的一个正态分布。基于诱变效应的随机性,一般地,我们可以认为突变部分的分布也是正态的。因此,一般的诱变分布,可以看成是残存分布与突变分布这两个正态分布的混合分布,这样的诱变分布称为均匀诱变分布。均匀诱变分布,在微生物诱变育种中具有广泛的意义,从笔者收集的我国微生物诱变育种有关统计资料的42例来看,它们的诱变分布都可以近似地看作均匀诱变分布。

弃去滤渣,将滤液放入氧化柱中,放清水将氧化柱充满,按比例加葡萄糖、尿素、磷酸二氢钾(C:N:P = 100:5:1),然后通气曝气。挂膜期间两个氧化柱并联,即:



挂膜期间,每24小时间歇补料一次,经常镜检观察生物相,培养5天,生物膜基本形成。然后将两个氧化柱改成串联以开始驯化,第一天投稀释液20%,清水80%(含有部分营养),第二天稀释液增加至40%,清水减至60%,至第五天全部进稀释废水。在驯化中发现球菌越来越少,且氧化柱2中的原

设残存分布(与出发菌株的产量分布一致)服从正态分布 $N(\mu_0, \sigma_0^2)$, 它的分布函数为

$$R(x) = \frac{1}{\sigma_0 \sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^x \exp \cdot \left\{ -\frac{(t-\mu_0)^2}{2\sigma_0^2} \right\} dt;$$

突变分布服从正态分布 $N(\mu_1, \sigma_1^2)$, 它的分布函数为

$$V(x) = \frac{1}{\sigma_1 \sqrt{2\pi}} \int_{-\infty}^x \exp \cdot \left\{ -\frac{(t-\mu_1)^2}{2\sigma_1^2} \right\} dt;$$

如果突变率为 p , 那么, 诱变分布的分布函数即为

$$\begin{aligned} F(x) &= (1-p)R(x) + pV(x) \\ &= \int_{-\infty}^x \left\{ \frac{1-p}{\sigma_0 \sqrt{2\pi}} \exp \cdot \left\{ -\frac{(t-\mu_0)^2}{2\sigma_0^2} \right\} + \frac{p}{\sigma_1 \sqrt{2\pi}} \exp \cdot \left\{ -\frac{(t-\mu_1)^2}{2\sigma_1^2} \right\} \right\} dt. \end{aligned}$$

这里, μ_0 和 σ_0^2 是残存分布的均值及方差, 由于它们也是出发菌株产量分布的均值及方差, 因而是已知; μ_1 及 σ_1^2 是突变分布的均值及方差, 这是未知; 突变率 p , 也是未知的。

设用 $E[f]$ 及 $D[f]$ 分别表示诱变分布的均值及方差, 这是可以通过样本加以估计的, 因此, 也可以在诱变处理后得到。由于

$$E[f] = (1-p)\mu_0 + p\mu_1$$

$$= \mu_0 + p(\mu_1 - \mu_0),$$

$$\begin{aligned} D[f] &= (1-p)\sigma_0^2 + p\sigma_1^2 \\ &\quad + p(1-p)(\mu_0 - \mu_1)^2, \end{aligned}$$

故所以我们面临的问题是: 怎样从 $\mu_0, \sigma_0^2, E[f]$ 及 $D[f]$ 去算出 p, μ_1 及 σ_1^2 。也就是说, 在知道了出发菌株产量分布的均值与方差, 以及诱变分布的均值与方差以后, 是否可以求出突变率? 而突变分布的均值与方差顺带地也被提出在问题之中。

这个问题, 可以从方程组

$$\begin{cases} \mu_1 - \mu_0 = (E[f] - \mu_0) \div p, \\ \sigma_1^2 = [D[f] - (1-p)\sigma_0^2 - p(1-p) \cdot (\mu_1 - \mu_0)^2] \div p, \\ 1-p = [f(\mu_0) - p v(\mu_0)] \div r(\mu_0), \\ V(\mu_0) = \frac{1}{\sigma_1 \sqrt{2\pi}} \exp \left\{ -\frac{(\mu_0 - \mu_1)^2}{2\sigma_1^2} \right\} \end{cases} \quad (1)$$

得到解决。其中, $r(\mu_0)$ 是残存分布中对应于均值 μ_0 的频率, 即出发菌株产量分布中均值的频率, 因而是已知; $f(\mu_0)$ 是诱变分布中对应于残存均值(注意不是诱变分布的均值)的频率, 这也可以在诱变处理后得到。因此, 突变率 p 、突变均值 μ_1 及突变方差 σ_1^2 可以由方程组(1)唯一确定。但是由于方程组(1)的最后一个方程是超越的, 一般情况下, p, μ_1, σ_1^2 不能用初等方法解出, 为此, 笔者提出了解决这个问题的迭代法。下面举例加以说明。

张筱玉等^[4]用 CO_2 激光诱变红霉素链霉菌(*Streptomyces erythreus*)1-36菌株, 1-36菌株的产量分布及1-36菌株经 CO_2 激光照射2分钟、4分钟所得诱变分布, 可用直方

生动物比氧化柱1更活跃。

废水处理操作时, 进水控制COD20,000毫克/升, 流量2升/小时, 停留时间10小时, pH 6~8, 温度22~28℃, 通气量0.015 m^3 /时, 气水比(容积比)80~100, 出水COD平均356毫克/升, 去除率82%, 去除负荷2公斤COD/ $\text{m}^3 \cdot \text{天}$ 。

试验表明悬浮粒子生物膜法比活性污泥法和接触氧化法有更高的处理效果, 其主要原因是具有很大的接触表面积, 本法占地面积小, 也是其优点之一。如有选择地开展菌种驯化工作, 采用二段或多段生物法处理, 对于含有机物浓度很高的抗生素生产废水的处理, 可取得更好的效果。

图表示如下(图1):

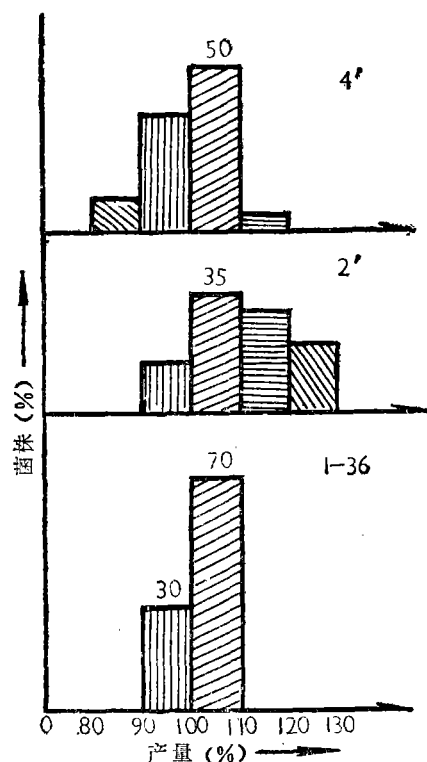


图1 CO₂激光诱变红霉素链霉菌

从1-36菌株产量分布直方图,可以算出产量分布的均值(即残存分布的均值)为

$$\mu_0 = 102$$

(这里, μ_0 是估计值而不是期望值,为避免过多的符号导致不必要的困难,沿用同一符号,以下均同,读者不难自行分辨),产量分布的方差(即残存分布的方差)为

$$\sigma_0^2 = 21.$$

从而还可以得到

$$r(\mu_0) = \frac{1}{\sigma_0 \sqrt{2\pi}} = 0.0870.$$

1. 在两分钟的剂量下

从1-36菌株经CO₂激光2分钟诱变处理后所得的诱变分布直方图,可以算出诱变分布的均值为

$$E[f] = 110.5,$$

诱变分布的方差为

$$D[f] = 94.75.$$

从产量分布及诱变分布的直方图中,在横坐

标为 $\mu_0 = 102$ 处,得到两个纵坐标 α_1 及 α_2 ,则有

$$f(\mu_0) = \frac{\alpha_2}{\alpha_1} \cdot r(\mu_0) = 0.0435.$$

迭代的起点为:假设 $p_1 v_1(\mu_0) = 0$,从方程组(1)的第三个方程就有

$$\begin{aligned} 1 - p_1 &= [f(\mu_0) - p_1 v_1(\mu_0)] + r(\mu_0) \\ &= 0.0870 + 0.0435 \\ &= 0.5, \end{aligned}$$

$$\therefore p_1 = 0.5,$$

代入第一、二两个方程就有

$$\begin{aligned} \mu_{11} - \mu_0 &= (E[f] - \mu_0) + p_1 \\ &= (110.5 - 102) + 0.5 \\ &= 17, \end{aligned}$$

$$\therefore (\mu_{11} - \mu_0)^2 = 289,$$

$$\begin{aligned} \sigma_{11}^2 &= [D[f] - (1 - p_1)\sigma_0^2 \\ &\quad - p_1(1 - p_1)(\mu_{11} - \mu_0)^2] + p_1 \\ &= (94.75 - 0.5 \times 21 - 0.5 \\ &\quad \times 0.5 \times 289) + 0.5 \\ &= 24, \end{aligned}$$

代入第四个方程就有

$$\begin{aligned} p_1 v_1(\mu_0) &= p_1 \cdot \frac{1}{\sigma_{11}} \cdot \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \\ &\quad \cdot \exp \left\{ -\frac{(\mu_0 - \mu_{11})^2}{2\sigma_{11}^2} \right\} \\ &= 0.5 \times 0.2041 \\ &\quad \times 0.3986 \times 0.0024 \\ &= 0.0001. \end{aligned}$$

上面,我们从“假设 $p_1 v_1(\mu_0) = 0$ ”出发,得到了 $p_1 v_1(\mu_0) = 0.0001$,由于所用数值最多精确到第四位小数,因此,0.0001是可以允许的误差,也就是说 $p_1 v_1(\mu_0) = 0.0001$ 可以看成与“假设 $p_1 v_1(\mu_0) = 0$ ”相符,因而“假设 $p_1 v_1(\mu_0) = 0$ ”是合理的,可以接受由此推算而得的

$$\text{突变率} \quad p = 0.5,$$

$$\text{突变均值} \quad \mu_1 = 119,$$

$$\text{突变方差} \quad \sigma_1^2 = 24.$$

这里,突变均值较出发菌株产量分布的均值有显著的增加,突变方差较出发菌株产

量分布的方差略有扩大,这是一个相当好的诱变结果。

(2) 在 4 分钟剂量下

从 1-36 菌株经 CO₂ 激光 4 分钟诱变处理后所得的诱变分布直方图,可以算出对应的诱变分布均值为

$$E[f] = 100,$$

诱变方差为

$$D[f] = 55,$$

还可以得到

$$f(\mu_0) = \frac{\alpha_3}{\alpha_1} r(v_0) = 0.0621,$$

这里, α_3 是 4 分钟诱变分布直方图中对应于横坐标为 $\mu_0 = 102$ 处的纵坐标值。

假设 $p_1 v_1(\mu_0) = 0$, 就可以从方程组(1)推算得出

$$1 - p_1 = 0.7138,$$

$$p_1 = 0.2862,$$

$$\mu_{11} - \mu_0 = -7.0$$

$$(\mu_{11} - \mu_0)^2 = 49,$$

$$\sigma_{11}^2 = 104.8,$$

从而就有

$$p_1 v_1(\mu_0) = 0.0088.$$

上面,从“假设 $p_1 v_1(\mu_0) = 0$ ”出发,却得到了“ $p_1 v_1(\mu_0) = 0.0088$ ”,这说明“假设 $p_1 v_1(\mu_0) = 0$ ”是不合理的,由这个假设推算而得的各个数值不应予以接受。

作为第二次迭代的开始,假设 $p_2 v_2(\mu_0) = 0.0088$, 代入方程组(1)就可以得到

$$1 - p_2 = 0.6126,$$

$$p_2 = 0.3874,$$

$$\mu_{12} - \mu_0 = -5.16,$$

$$(\mu_{12} - \mu_0)^2 = 26.65,$$

$$\sigma_{12}^2 = 92.44,$$

从而就有

$$p_2 v_2(\mu_0) = 0.0139.$$

第二次迭代的结果,也是不能接受的。

再假设 $p_3 v_3(\mu_0) = 0.0139$, 这样就开始了第三次迭代,……

在第十一次迭代时,假设 $p_{11} v_{11}(\mu_0) =$

0.226, 从方程组(1)就可以得出

$$1 - p_{11} = 0.4540,$$

$$p_{11} = 0.5460,$$

$$\mu_{1,11} - \mu_0 = -3.66,$$

$$(\mu_{1,11} - \mu_0)^2 = 13.42,$$

$$\sigma_{1,11}^2 = 77.18,$$

从而就有

$$p_{11} v_{11}(\mu_0) = 0.0227.$$

第十一次迭代的结果已经是可以接受的了。

如果要求结果具有更高的精度,继续迭代下去,那么,第十四次迭代时,假设 $p_{14} v_{14}(\mu_0) = 0.0229$, 从方程组(1)就可以得出

$$1 - p_{14} = 0.4506,$$

$$p_{14} = 0.5494,$$

$$\mu_{1,14} - \mu_0 = -3.64,$$

$$(\mu_{1,14} - \mu_0)^2 = 13.25,$$

$$\sigma_{1,14}^2 = 76.91,$$

从而可得

$$p_{14} v_{14}(\mu_0) = 0.0229.$$

我们接受第十四次迭代而得的近似值

$$\text{突变率 } p = 0.55,$$

$$\text{突变均值 } \mu_1 = 98.4,$$

$$\text{突变方差 } \sigma_1^2 = 77.$$

可以看出,这与第十一次迭代的结果相差无几。

这里,突变率较前增加,但突变均值却低于出发菌株产量分布的均值,更显著低于前一个突变均值。因此,虽然这个突变方差有着显著增加,使得获得正变株亦有相当的可能,但相比之下,这个诱变结果是不及前面的那个。

进行估计突变率、突变均值及突变方差的实际工作时,很重要的一个数据就是诱变样本分布的自由度,也就是诱变处理后所挑取的单菌落数。这个数字愈大,结果愈可靠,但工作量也就愈大。可靠性与工作量,这是一对矛盾。问题在于如何根据育种者对可靠程度的要求选择一个适当的工作量。关于这个问题,笔者另文^[3]作专门讨论,这里就不再赘言。

青霉素过敏的免疫学检查

张 永 信

(上海华山医院)

青霉素是一种杀菌力强、毒性小、应用广的抗生素。一般剂量使用一年以上或一天静脉滴注超过1亿单位时皆无明显毒性反应；肾功能不全者按常用剂量使用也不致引起蓄积中毒。可是青霉素过敏名列各种药物反应的首位，而且过敏性休克发生率也最高。Welch⁽¹⁾调查了美国八百家医院1953—1957年发生的药物反应，在2,995例反应中青霉素引起的占84%，其中809例即刻反应中青霉素占98%，死亡率9%。WHO 1968年统计⁽²⁾，青霉素反应率为0.7~10.0%，休克发生率为4~15/10万，致死率为15~20/100万。美国每年死于青霉素严重反应的约100~300人⁽³⁾。国内报导青霉素过敏发生率约5~6%⁽⁴⁾。李氏⁽⁵⁾统计1952~1976年国内报导青霉素过敏性休克约565例，死亡97例(17.2%)。可见青霉素过敏严重地危及病员的生命与健康，也阻碍它的广泛使用。

青霉素过敏如何预测，过敏者在什么条件下可重新使用，如何脱敏，人们开展了大量的研究工作。

随着免疫学的进展，目前对青霉素过敏

机制有了较多的认识。青霉素乃是由 β -内酰胺和噻唑二个环组成的简单化合物，本身并不引起过敏反应。只有当它及其降解的产物与大分子载体(如蛋白质、多肽)结合成全抗原时，才引起各种类型的免疫反应^(6,7,8)。青霉素的过敏原一般分为二类^(9,10,11)：(1)大抗原决定簇(the major antigenic determinant)：青霉素在溶解时小部分直接打开 β -内酰胺环与蛋白质结合成青霉噻唑蛋白，大部分高度降解产生青霉烯酸再与蛋白质结合成青霉噻唑蛋白。大抗原决定簇是引起大多数青霉素过敏的因素，主要与荨麻疹、溶血性贫血和血清病样反应有关(见表)。(2)小抗原决定簇(the minor antigenic determinant)：指青霉素降解产物如青霉噻唑酸、青霉吡啶酸、派拉马地酸、青霉醛酸、青霉烯酸、青霉胺和6-APA等。它们数量少，但可能与I型变态反应包括过敏性休克有关。至于高分子聚合物对过敏反应的作用可能不大。

减少青霉素过敏反应的关键是寻找准确而简便的预测过敏状态的方法，当然提高制

参 考 文 献

- [1] 刘垂珩：1980，微生物学报，20(2)：166-172。
- [2] 刘垂珩：微生物诱变的统计学研究，待发表。
- [3] 刘垂珩：微生物育种工作量的估计，待发表。
- [4] 张筱玉等：1978，红霉素链霉菌13-123、9-203菌株的选育及发酵特性研究，第二届微生物遗传育种学术讨论会资料。

- [5] Mather, K. Jinks, J. L.: 1974, Biometrical Genetics, Cornell University Press, Ithaca, New York.
- [6] Fukunaga, K.: 1972, Introduction to Statistical Pattern Recognition, Academic Press, New York.
- [7] 杨纪珂：1964，数理统计方法在医学科学中的应用，上海科学技术出版社。

(1980年11月20日收稿)