arXiv:2304.00968v1 [physics.bio-ph] 3 Apr 2023

多个复制起点的同步复制起始

Mareike Berger[1] 和 Pieter Rein ten Wolde[1]

[1]*Biochemical Networks Group, Department of Information in Matter, AMOLF, 1098 XG Amsterdam, The Netherlands*

在营养丰富的环境中，细菌 *Es-cherichia coli* 若能在多个复制起点同步启动复制，分裂速度甚至可以快于复制完整条染色体所需的时间。然而，导致复制起始同步发生的机制仍未得到充分理解。通过数学建模，我们根据两个量识别出四种不同的同步化模式：所谓许可期的持续时间（在第一个复制起点触发后，细胞内起始势仍保持较高水平的时间）以及阻断期的持续时间（已启动的复制起点保持受阻的时间）。要实现同步复制起始，许可期必须足够长，使所有复制起点都能启动；但又必须短于阻断期，以防止已触发的复制起点再次起始。我们得到了同步程度关于许可期持续时间的解析表达式，并通过模拟加以验证。模型表明，第一个与最后一个复制起点触发之间的延迟随起始体积的变异系数（CV）变化。将这些结果与实验测量值相匹配后发现，触发速率必须随细胞体积增加而上升，其有效希尔系数至少为 20；此时，所有复制起点都在阻断期结束前触发的概率至少为 92%。因此，我们的分析揭示，起始体积较低的变异系数是同步复制起始的结果。最后，我们表明，先前提出的用于调控 *E. coli* 中复制起始的分子模型，在生物学上合理的参数下能够产生同步复制起始。

I Introduction

高保真地将遗传信息从一代传递到下一代，对每种生物的生存都至关重要。许多细菌含有多份染色体 [1–6]。在营养丰富的环境中，细菌大肠杆菌 会以极高的精确度同步启动同一染色体多个拷贝的 DNA复制 [2–4, 7]。早在20世纪60年代，Cooper 和 Helmstetter 就提出，在多个复制起点同步启动新一轮复制，使大肠杆菌 能够以快于复制完整条染色体所需固定时间的速度分裂 [8]：在母细胞中开始的复制轮次会在细胞分裂期间继续进行，并且要到后续世代才完成（图1a）。为了确保在如此短的分裂时间下，所有子细胞都能获得一份完整复制的染色体，所有染色体都必须同步启动复制。后来，Skarstad 等人通过统计快速生长培养物中的复制起点数量，证实了 Cooper 和 Helmstetter 的预测：他们发现，大多数细胞有 2^n ($n = 1, 2, 3$)份染色体，只有一小部分细胞（2-7%）含有3、5、6或7条染色体 [9]。近期的单细胞测量确实表明，在快速生长状态下，大肠杆菌能够以极高的精确度，在多达八个复制起点同步启动复制 [2, 7]。然而，大肠杆菌 如何实现如此高的同步程度，仍然是一个未解之谜。

大肠杆菌 中的复制起始受起始蛋白 DnaA [10–13] 调控。该蛋白可在两种核苷酸结合状态之间切换：一种是 DnaA 与 ADP 结合的非活性状态，另一种是 DnaA 与 ATP [13–18]结合的活性状态。非活性和活性形式都能与复制起点结合，但非活性状态的结合并不足以启动复制：复制起始需要 ATP-DnaA [12, 19–21]与复制起点结合。越来越多的证据表明，DnaA 与复制起点的结合，进而复制起始，受两种不同机制调控：滴定和蛋白质激活[13, 18, 22]。染色体上的高亲和力 DnaA结合位点通过滴定 DnaA，使可用于结合复制起点的游离 DnaA 浓度呈周期性变化 [13, 23], ；而激活开关则使活性 DnaA 所占比例呈周期性变化 [18, 24, 25]。这两个周期共同作用，使游离且具有活性的 DnaA 浓度产生稳定的振荡 [26]。游离且具有活性的 DnaA 浓度构成细胞的起始潜能，决定复制起点激活的倾向。

起始同步性意味着所有复制起点都在每个细胞周期内起始，但每个细胞周期也只能起始一次。这是一项重大挑战，因为细胞需要满足两个可能相互冲突的约束。所有复制起点都必须在每个细胞周期内启动，这意味着当第一个复制起点启动时，起始势不能立即下降：它必须继续上升，使其他复制起点也能启动。另一方面，已经启动的复制起点不应再次启动，即使起始势仍在上升。看来大肠杆菌 采用了两种不同的机制来满足这两个约束。起始势（游离且有活性的 DnaA 的浓度）的振荡构成一种全局机制，不仅诱导第一个复制起点启动，还促使并允许其余复制起点启动（图1a）。为了防止已经启动的复制起点立即再起始，细胞会采用一种局部机制。

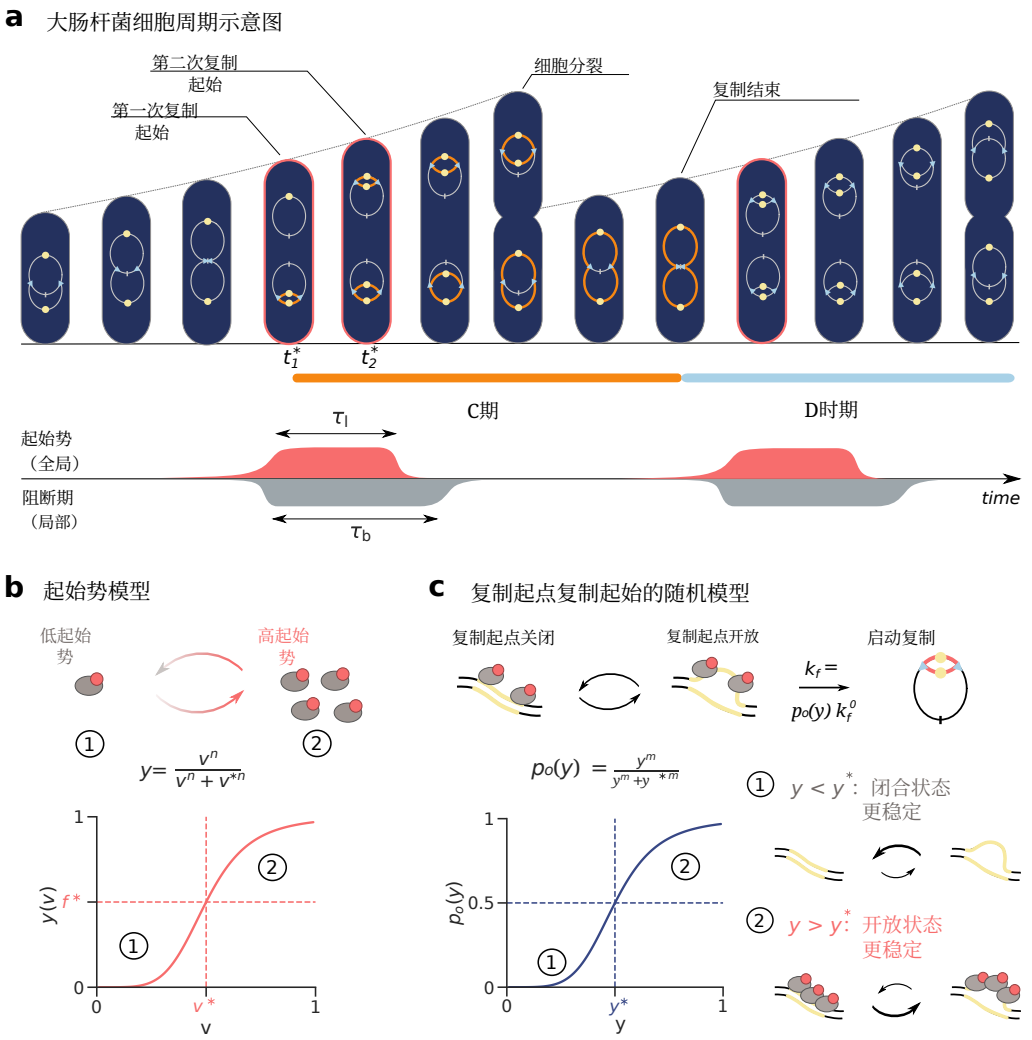

图1. **每个复制起点处随机复制起始的模型**。(a) *E. coli*的细胞周期示意图：细胞体积以生长速率 λ呈指数增长。当倍增时间 $\tau_{\mathrm{d}} = \ln(2)/\lambda$ 短于复制完整条染色体并完成分裂所需的时间（C+D时期）时，细胞出生时通常已处于一轮染色体复制过程中。复制在时间 t_1 和 t_2分别以随机方式在各复制起点（黄色圆圈）启动，复制叉（蓝色三角形）以恒定的复制速度向复制终止区（灰色条带）推进。在 *E. coli*，所有复制起点都在极短的时间间隔内启动，从而实现同步复制起始。要实现同步复制起始，需要全局和局部两种机制：全局机制在许可期 τ_{l} 内维持较高的起始势（红色阴影区域），而基于 SeqA 的局部机制则在阻断期 $\tau_{\mathrm{b}} > \tau_{\mathrm{l}}$ 内阻止已启动的复制起点再次启动（灰色阴影区域）。在我们的模型中，复制启动后经过固定的循环时间 $\tau_{\mathrm{cc}} = T_{\mathrm{C}} + T_{\mathrm{D}}$，细胞便会分裂。(b) 我们通过希尔函数，根据细胞内每个复制起点的体积 $v = V/n_{\mathrm{ori}}$ 对起始势 y 进行建模，希尔系数为 $n_{\circ}$ 当每个复制起点的体积达到临界值 v^* 时，起始势等于临界起始势 $y^* = 0.5_{\circ}$ (c) 将复制起始建模为复制起点处随细胞内起始势变化的随机过程：复制起点可以处于开放或闭合构象；若处于开放状态，复制可以按恒定速率 k_{f}^0启动。处于开放状态的概率 $p_{\circ}(y)$ 取决于细胞内的起始势，并通过希尔函数建模，其希尔系数为 m，DnaA 的临界活性分数为 f^*。

防止新复制的复制起点立即再起始的局部机制，基于所谓的对这些复制起点的隔离。在大肠杆菌中，复制起点启动复制后，SeqA蛋白会短暂地与该复制起点结合，从而阻止同一复制起点立即再次启动新一轮复制 [27, 28]。当隔离所需的两种蛋白质 SeqA 或 Dam 中的任一种在...

...之后复制起始相关机制被删除后，同步性便会丧失，复制会在整个细胞周期内启动[27, 29]。因此，在所谓的阻断期内阻断近期已启动的复制起点，是确保复制起始同步的关键机制（图1a）。

起始势的全局振荡与局部复制起

点隔离相结合，前者促使所有复制起点启动，后者则防止新复制的复制起点再次起始，这似乎是解决起始同步性问题的巧妙方案。然而，仍有许多问题有待解答。新复制的复制起点只会被隔离有限的一段时间：阻断期约为 10 分钟 [12, 29, 30]。因此，在最初的复制起点启动后，起始势必须继续上升足够长的时间，以使其余复制起点都能启动；但在阻断期结束之前，起始势也必须下降，否则新复制的复制起点最终仍会再次启动。由此，复制起点能够启动的许可期必须足够长，以确保所有复制起点都能启动，同时又必须短于阻断期（图1a）。鉴于阻断期只有 10 分钟，这一约束很可能带来重大挑战。

复制同步性的问题因这样一个事实而更加复杂：复制起始势的振荡直接受到DNA复制起始本身的影响 [27]。当一个新的复制起点被触发时，新生成的复制体将激活称为 RIDA 的失活机制 [12, 18, 31, 32]。此外，在某个复制起点开始DNA复制几分钟后，位点 $datA$ 会被复制，这会通过刺激与 DnaA 结合的 ATP 水解来增强失活作用 [16, 33–36]。此外，新复制的 DNA 会带来新的滴定位点 [13, 23], ，它们也会通过降低细胞质中 DnaA 的浓度而趋于降低起始势。这些分子机制如何导致起始势在许可期内持续上升，随后又在阻断期结束前下降，目前仍远未得到充分理解。

为了研究如何在多个复制起点同步启动复制，我们首先提出一个最简粗粒化模型：当细胞达到每个复制起点对应的临界体积时，起始势便会上升。每个复制起点都可以随机地启动，其起始概率取决于起始势。该模型包含一个许可期，在此期间起始势上升，复制起点可以触发；还包含一个阻断期，在此期间新触发的复制起点不能再次触发。通过改变许可期和阻断期的持续时间，我们发现了四种状态。其中只有一种能够产生稳健的同步复制起始。具体而言，要实现同步起始，许可期必须足够长，使所有复制起点都能触发，但又必须短于阻断期。然而，鉴于测得的阻断期仅为 10 分钟 [12, 29, 30], ，许可期必须短于 10 分钟。若要在这一短暂的阻断期内以 92% 的成功率触发所有复制起点，触发速率必须随体积增加而上升，且希尔系数至少为 20；这样，首次与末次起始事件之间的平均时间便会少于 4 分钟，与 Skarstad 等人的实验测量结果一致 [9]。因此，我们的建模为大肠杆菌中的 DNA复制起始为何受到如此严格的控制这一问题提供了一个解释。

随后，我们探究如何实现这些一般性的同步要求：我们用先前提出的分子模型取代粗粒化起始势，从而研究这些要求如何在细菌大肠杆菌中实现。在该模型中，游离ATP-DnaA浓度在整个细胞周期 [26]中呈振荡变化；为此，我们将模型扩展到纳入随机复制起点激活。我们发现，如果复制起始受DnaA激活开关 [13, 18, 24, 25], 控制，那么只有在狭窄的参数范围内才能实现起始同步性，而这很难与实验测得的数值相符。加入滴定 [11, 22, 23] ，并使系统进入这样一种状态：在细胞周期的大部分时间里，细胞质中的DnaA浓度都较低，这会通过使每个复制起点的临界体积处起始势的上升更加陡峭，显著提高同步程度。这表明，将基于滴定的浓度循环与蛋白质激活周期相结合，对于在细菌大肠杆菌中实现多个复制起点的同步复制起始至关重要。

II The licensing period must be non-zero and shorter than the blocking period

我们用于研究随机复制起始对细胞周期影响的粗粒化模型由两部分组成：首先，我们将细胞中可用起始蛋白的量建模为起始势 y，该起始势根据每个复制起点的体积 $v(t) = V(t)/n_{\mathrm{ori}}(t)$而变化，具体如下

$$y(v) = \frac{v^n}{v^n + v^{*n}} \tag{1}$$

其中希尔系数为 n ，每个复制起点的临界体积为 v^*（图1b）。其次，将每个复制起点建模为一个二态系统，可在开放构象和闭合构象之间随机切换（详情见附录 VIII A）。鉴于当细胞中的起始势 y 较高时，复制起点更可能处于开放状态，我们假设处于开放状态的概率 p_{o} 随激活势y 增加，具体如下

$$p_{\mathrm{o}}(y) = \frac{y^m}{y^m + y^{*m}} \tag{2}$$

希尔系数 m 和临界起始势能 y^* （图1c）。从分子层面看，这种非线性开放概率 $p_{\mathrm{o}}(y)$可能源于起始因子与复制起点的协同结合，也可能源于 Monod-Wyman-Changeux 模型：结合到复制起点上的起始因子越多，开放构象在能量上就越有利。假设复制起点的开放和关闭动力学很快，则复制起点激活速率等于处于开放状态的概率 p_{o} 乘以最大起始频率 k_{f}^0:

$$k_{\mathrm{f}} = k_{\mathrm{f}}^0\, p_{\mathrm{o}} \tag{3}$$

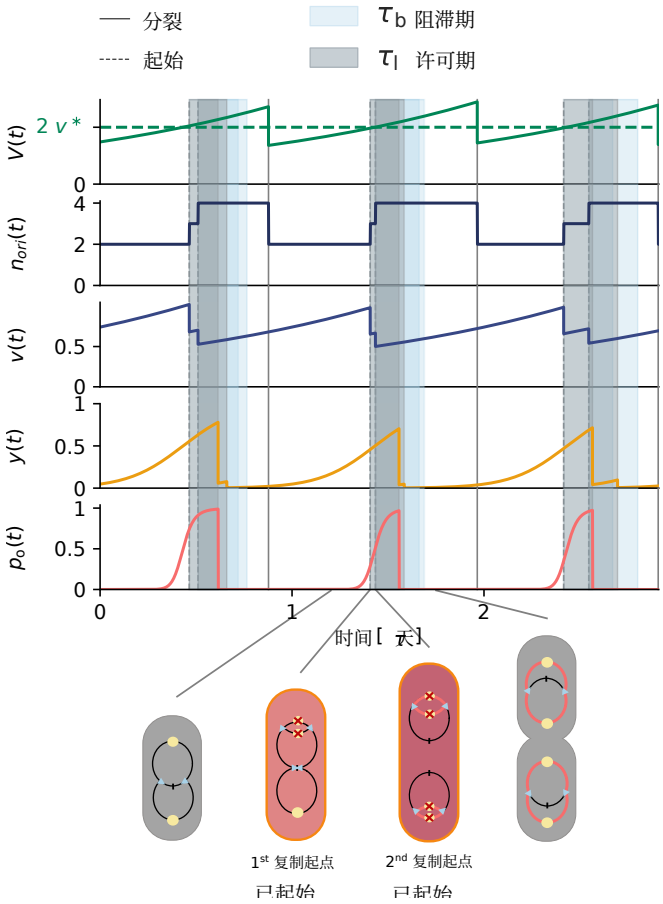

图2。**通过引入阻断期和许可期，复制会在多个复制起点同步起始**。体积 $V(t)$、复制起点数量 $n_{\mathrm{ori}}(t)$、单位复制起点数的体积 $v(t) = V(t)/n_{\mathrm{ori}}(t)$ 、起始势 $y(t)$ 和开放概率 $p_{\mathrm{o}}(t)$ 随时间（以细胞倍增时间为单位） τ_{d}的变化。每个复制起点都会随机地起始（灰色虚线），在阻断期 τ_{b} （浅蓝色阴影区域）内，新复制的复制起点无法再次起始。在许可期 τ_{l} （灰色阴影区域）内，起始势 $y(t)$和开放概率 $p_{\mathrm{o}}(t)$持续升高，因此尚未起始复制的其余复制起点也会起始。许可期结束时，起始势 $y(t)$随即下降至较低值，因此开放概率 $p_{\mathrm{o}}(t)$也随之下降，使再次起始极不可能。在细胞分裂时（灰色实线），细胞体积减半，并随机选择两条染色体中的一条进入下一个细胞周期。下方示意图展示了细胞周期四个不同时刻的细胞及其环状染色体。复制从复制起点（黄色圆圈）开始，经由两个复制叉（浅蓝色三角形）向复制终止区（黑色条）推进。被阻断的复制起点以红色叉号标记，细胞的阴影颜色表示细胞内的起始势是低（灰色）还是高（红色）。（所有参数见表 I。）

为研究随机复制起始对大肠杆菌细胞周期的影响，我们将细胞体积$V(t)$建模为指数函数， $V(t) = V_{\mathrm{b}}\, e^{\lambda t}$，其中生长速率 λ =ln(2)/τ_{d}，细胞倍增时间为 τ_{d}，是一个模型参数。我们追踪染色体的数量及其复制状态（例如，已完全复制或正在复制）；每当复制起点在时间 t^* 激活并开始新一轮复制时，就将一个新的分裂时间设定为起始后经过固定循环时间 τ_{cc} 的时刻 $\tau_{\mathrm{div}} = t^* + \tau_{\mathrm{cc}}$。固定循环时间 τ_{cc} 等于复制整个染色体所需的时间 T_{C} 与复制结束到细胞分裂之间的时间 T_{D} 之和（图1a）。每个设定的分裂时间 τ_{div} 都与刚刚开始复制的染色体关联。这样可确保细胞不会在染色体复制完成前分裂（图 VIII.4）。到达下一个分裂时间时，细胞体积减半，并随机保留两个子染色体中的一个，进入下一个细胞周期。如果细胞继承的染色体已开始复制但尚未到达其分裂时间，它也会继承下一个分裂时间（图 VIII.4）。

若要在多个复制起点处实现同步复制起始，则在首次起始事件发生后的许可时间 τ_{l} 内，起始势必须保持较高；同时，必须在阻断时间 $\tau_{\mathrm{b}} > \tau_{\mathrm{l}}$内阻止已启动的复制起点再次起始。为了研究随机复制起始对同步程度的影响，我们考察快速生长状态（$\tau_{\mathrm{d}} < \tau_{\mathrm{cc}}$），此时在复制起始时，细胞中通常有两个或更多复制起点。下文将重点讨论细胞周期开始时有两个复制起点的状态，同时也说明这些结果可推广至细胞周期开始时有更多复制起点的状态。在达到每个复制起点的临界体积 v^*时，激活势 $y\,(t)$ 上升，启动复制的概率 $p_{\mathrm{o}}\,(t)$ 大幅增加（图2，最下方的面板）。当第一个复制起点启动复制时，细胞中的复制起点数量逐步增加，每个复制起点的体积 $v\,(t)$ 则瞬间下降（图2，第二和第三个面板）。如果起始势 $y\,(t)$ （因此开放概率 $p_{\mathrm{o}}\,(y)$ 也）立即随每个复制起点的体积变化，那么第二个复制起点也启动复制的可能性就会变得很低，从而导致复制起始不同步。因此，我们引入许可时间 τ_{l}，在此期间，起始势尚未感知每个复制起点的体积 $v\,(t)$ 变化，因而继续上升（图2）。因此，开放概率 $p_{\mathrm{o}}\,(t)$ 会在此许可时间内急剧上升，第二个复制起点也会随机地启动复制。为了防止已启动的复制起点再次启动，我们还引入阻断期 τ_{b}，在此期间，同一个复制起点不能再次启动复制（图2，示意图中红色打叉的复制起点）。许可时间结束时，激活势会根据细胞中当前的复制起点数量进行更新，因此瞬间下降（图2，第四个面板）。对于足够长的

许可时间，以及长于许可时间的阻断期 $\tau_{\mathrm{b}} > \tau_{\mathrm{l}}$，我们确实可以获得具有同步复制起始事件的稳定细胞周期（图2）。

为了量化给定参数组下复制起始的同步程度，我们将同步程度 s 定义为起始期 t_{i} 开始到结束时复制起点 Δn_{ori}数量的变化，相对于起始期 t_{f}开始时复制起点 $n_{\mathrm{ori}}(t_{\mathrm{i}})$的数量（图3a）：

$$s = \frac{\Delta n_{\mathrm{ori}}}{n_{\mathrm{ori}}(t_{\mathrm{i}})} = \frac{n_{\mathrm{ori}}(t_{\mathrm{f}}) - n_{\mathrm{ori}}(t_{\mathrm{i}})}{n_{\mathrm{ori}}(t_{\mathrm{i}})} \tag{4}$$

起始期 t_{i} 的开始时间定义为第一个复制起点被激活的时刻；当第一个已激活的复制起点的许可期结束时 $t_{\mathrm{f}} = t_{\mathrm{i}} + \tau_{\mathrm{l}}$，起始期便告结束。当同步程度 s为1时，复制同步起始，因为起始期开始时存在的所有复制起点都已被激活（图1a）。当 $s < 1$ 或 $s > 1$时，复制分别起始不足或起始过度（图3a）。我们在许多细胞周期中测量同步程度 s，以获得任意参数组下的平均同步度 $\langle s \rangle$。

通过改变许可期和阻断期的持续时间，我们发现了四种不同的同步化模式（图3）。所有模拟均从一条已完全复制的染色体开始；如果复制以完全同步的方式起始，系统最终会稳定在一种状态：复制起点数量在2到4之间振荡。然而，只有在模式4中，复制才会同步起始（图3b，模式4）。当阻断期 τ_{b} 为零、但许可期 τ_{l} 大于零时，复制会严重过度起始，以至于无法形成稳定的细胞周期（图3b，模式1，灰色区域）。另一方面，如果许可期 τ_{l} 为零或非常短，而阻断期 τ_{b} 大于 τ_{l}，则会出现同步程度很低的细胞周期：每次起始事件发生后，起始势迅速下降，从而阻止进一步的起始事件。这会导致整个细胞周期中周期性地发生彼此独立的起始事件（图3b，模式2）。当许可期和阻断期都不为零，且许可期长于阻断期 $\tau_{\mathrm{l}} > \tau_{\mathrm{b}}$时，已经启动复制的复制起点可在许可期结束后再次启动。这会导致起始事件中所有复制起点同步启动，但启动事件数量过多。如图3b所示，在第三种模式下，复制起点的数量会在一个起始持续时间内从1增加到4，而不是在2到4之间振荡。因此，我们将这种模式称为“过度同步”。只有当许可期 τ_{l} 足够长，且阻断期更长 $\tau_{\mathrm{b}} > \tau_{\mathrm{l}}$ 时，复制才会在每个细胞周期中仅同步起始一次（图3b，模式4）。

III A STEEP RISE IN THE ORIGIN OPENING PROBABILITY IS ESSENTIAL

一个关键问题是，是什么决定了同步化模式2的大小。过度起始（图3b，模式3）向完全同步状态（图3b，模式4）的转变十分 abrupt，且由条件 $\tau_{\mathrm{b}} > \tau_{\mathrm{l}}$明确界定；而同步不足（图3b，模式2）向完全同步状态（图3b，模式4）的转变则较为平缓，这两种模式之间没有明确的界限。接下来，我们仍先聚焦于细胞周期开始时有两个复制起点的模式，并说明不同延迟时间 τ_{l} 和希尔系数 n 与 m下的平均同步度 $\langle s \rangle$，可以根据两个独立起始点在时间间隔 $\Delta t < \tau_{\mathrm{l}}$内启动的概率推导得出。

为了计算两个相互独立的起始事件在时间间隔 Δt内发生的概率，我们首先推导瞬时起始概率 $k_{\mathrm{f}}(t) = k_{\mathrm{f}}^{0}\, p_{\mathrm{o}}(t)$ 的解析表达式。在我们的模型中，开放概率 $p_{\mathrm{o}}(y)$ 通过激活势 $y(v)$ 间接取决于随时间变化的每个复制起点的体积 $v(t)$，见方程 1 和 2。然而，开放概率作为每个复制起点的体积 v 的函数，可以用希尔函数近似（推导见附录 VIII B）

$$p_{\mathrm{o}}(v) \approx \frac{v^{n_{\mathrm{eff}}}}{v^{n_{\mathrm{eff}}} + v^{*n_{\mathrm{eff}}}} \tag{5}$$

有效希尔系数

$$n_{\mathrm{eff}} = \frac{n\,m}{2}. \tag{6}$$

当激活势和开放概率的希尔系数 n和 m都相对较高时，这是对开放概率 $p_{\mathrm{o}}(y(v))$ 的良好近似（见方程 1 和 2 以及图 VIII.1c 和 d）。此时，触发速率由方程 3 给出，其中采用了方程 5 的近似开放概率 $p_{\mathrm{o}}(v)$。接下来，我们采用参考文献 [2] 提出的方法，选择最大触发速率 k_{f}^{0}，使平均起始体积 $\langle v^{*} \rangle$ 等于方程 5 中的理论起始体积 v^{*}（见附录 VIII C）。利用这一开放概率的解析近似，在希尔系数 n 和 m足够高的状态下，我们现在可以计算两个相互独立的起始事件在时刻 t_1 和 $t_2 > t_1$ 发生在时间间隔 $\Delta t = t_2 - t_1 \leq \tau_{\mathrm{l}}$ 内的概率（附录 VIII D）。为了将此概率 $\langle P(\Delta t < \tau_{\mathrm{l}}) \rangle$ 与在起始事件开始时存在两个复制起点的生长状态下，通过模拟得到的同步程度进行比较，我们将该概率重新缩放至 $s_{\min} = 0.5$ 到 $s_{\max} = 1$:

$$s_{\mathrm{th}} = 0.5 + \langle P(\Delta t < \tau_{\mathrm{l}}) \rangle \times 0.5 \tag{7}$$

不同希尔系数 n 下，平均同步度 $\langle s \rangle$ 随许可期 τ_{l} 的变化，以及

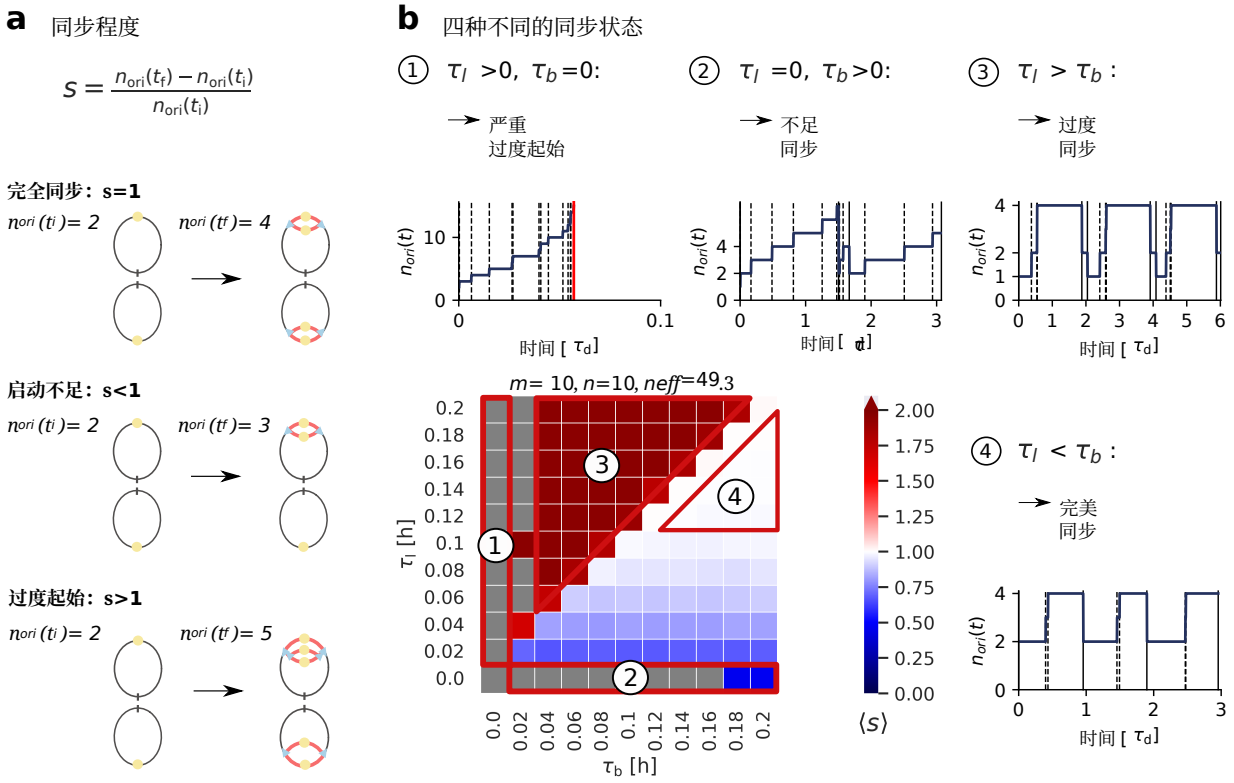

图3. **只有当许可期足够长、但短于阻断期时，复制才会同步起始。**(a) 起始级联的同步程度 s 定义为起始级联结束时的复制起点数量 n_{ori}（t_{f}）减去起始级联开始时的复制起点数量 n_{ori}（t_{i}），再除以起始级联开始时的复制起点数量 n_{ori}（t_{i}）。起始级联始于第一个复制起点启动的时刻，并在许可时间 τ_{l}之后结束。当级联开始时存在的所有复制起点都在级联期间恰好启动一次（$s = 1$）时，复制便会同步起始；若启动的复制起点较少或较多，则复制分别为起始不足或起始过度。(b) 平均同步度 $\langle s \rangle$ 随许可期 τ_{l} 和阻断期 τ_{b}变化。通过将开放概率 p_{o}（f（v））拟合至希尔函数 p_{o}（v），得到有效希尔系数 n_{eff}（附录 VIII B）。对于每组参数，平均同步度根据 $N = 5000$ 个连续细胞周期计算得出。图中展示了四种不同同步化模式下复制起点数量随时间变化的示例时间轨迹（时间以细胞倍增时间 τ_{d}为单位），具体模式如热图所示。无法获得细胞周期时，热图中相应区域标为灰色。（所有参数见表 I。）

m 确实可以用 s_{th} 很好地近似（图4a）。因此，图3b中从同步不足状态向完全同步状态的转变，取决于两个相互独立的复制起点激活事件在由许可时间 τ_{l}确定的短时间窗口内发生的概率。有效希尔系数 n_{eff}越高，在给定延迟时间 τ_{l}下，同步程度越高（图4a）。同步程度 $\langle s \rangle$ 随有效希尔系数升高而增加，因为这会使触发速率上升得更加陡峭，从而提高两个复制起点在许可时间 τ_{l} 内激活的可能性。

虽然同步程度 $\langle s \rangle$ 会随着 τ_{l}增加，但 τ_{l}不能长于阻断期 τ_{b}，否则已经启动的复制起点会再次启动。因此，阻断期限定了 τ_{l}。在细菌大肠杆菌中，阻断期 τ_{b} 的起因已有充分认识：SeqA蛋白可以结合在新复制的复制起点上的特定位点，这些位点与起始蛋白的结合位点重叠，因此能够阻止起始蛋白再次启动。大约十分钟后，SeqA蛋白解离，新一轮复制便可再次开始[12, 29, 30]。为防止过度起始，许可时间必须短于阻断期（图3b，情形3），因此大肠杆菌中的许可时间必须小于$\tau^{\mathrm{exp}}{}_{\mathrm{b}} = 10$ 分钟。图4a表明，这对希尔系数构成了重要约束：若要使同步程度 $\langle s \rangle$超过95%，有效希尔系数必须至少达到 $n_{\mathrm{eff}} = 30$。

问题仍在于，与实验结果一致的有效希尔系数n_{eff}是多少。有趣的是，Skarstad 等人测量了首次与末次激活事件之间的时间，我们可以将其与理论预测 [9]进行比较。不过，要做到这一点，我们必须先考察生长速率的影响，因为 Skarstad 进行测量时的生长速率更高。图 VIII.5 显示，平均同步度 $\langle s \rangle$ 随许可时间τ_{l} 的变化虽然会随有效希尔系数 n_{eff}而显著改变，但它

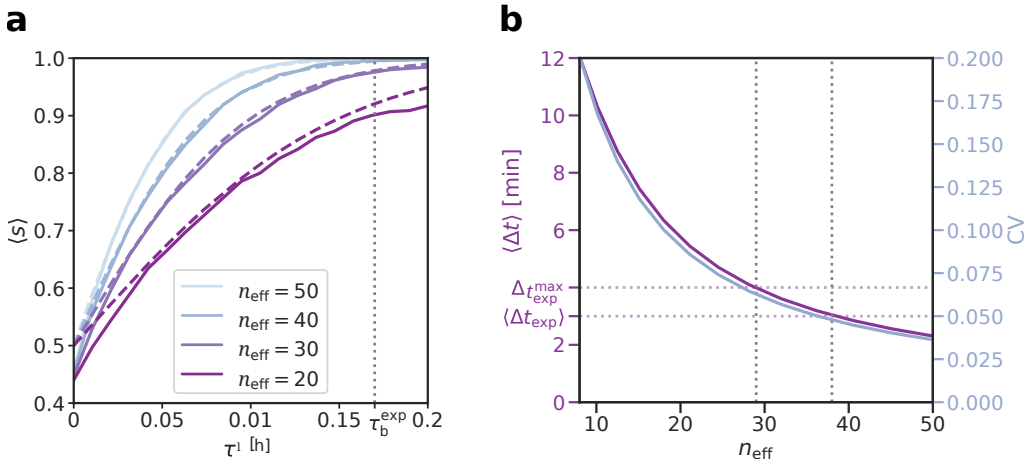

图 4. 实验观察到的高精度复制起始，是确保多个复制起点同步复制起始所必需的。(a) 模拟结果（实线）中，平均同步度 $\langle s\rangle$ 随许可时间τ_l 变化的关系，在不同有效希尔系数 $n_{\rm eff}$（其中 $n = m = \sqrt{2}\,n_{\rm eff}$）下，与附录 VIII D 推导出的理论预测（虚线）吻合良好。在延迟时间极短时，模拟与理论之间的微小差异源于：对于两个同步触发事件，理论中的最低同步程度为 $s_{\min} = 0.5$；而在模拟中，起始级联开始时可能存在更多复制起点，因此同步程度会更低 $s_{\min} < 0.5$。在这些模拟中，阻断期 $\tau_{\rm b}$ 设定为大于所有测试的许可 τ_l 时间（$\tau_{\rm b} = 0.25$ 小时），因此不会发生过度起始事件。最大放电率 $k_{\rm f}^0$设定为使平均起始体积 $\langle v^*\rangle$ 等于方程 5 中的理论起始体积 v^*，具体说明见附录 VIII C。实验测得的阻断期 $\tau^{\rm exp}$b 用灰色竖直点线标出。每组参数下的平均同步度均根据连续的 $N = 5000$ 个细胞周期计算得出。(b) 两个连续触发事件之间的理论平均时间间隔 $\langle\Delta t\rangle$（粉色曲线及坐标轴）和起始体积的变异系数（CV，蓝色曲线及坐标轴）随有效希尔系数 $n_{\rm eff}$ 变化的关系（推导见附录 VIII E）。Skarstad 等人 [9] 通过实验发现，在 B/r A *E. coli*菌株中触发所有复制起点的平均时间间隔约为 $\langle\Delta t_{\rm exp}\rangle$ =3 分钟，上限估计为 $\Delta t_{\rm exp}^{\max}$ =4 分钟（粉色水平点线）。因此，有效希尔系数处于范围 $n_{\rm eff} = 29-38$ 内（灰色竖直点线），对应的变异系数 CV 为=0.05-0.07。这与实验测得的起始体积精度（CV 为≤0.1 [2, 7, 37]）吻合良好。有趣的是，在 $n_{\rm eff} = 30$ 和 $n_{\rm eff} = 40$时，平均同步度分别为 $\langle s\rangle(n_{\rm eff} = 30)$ $= 0.975$ 和 $\langle s\rangle(n_{\rm eff} = 40)$ $= 0.996$，对应于所有复制起点同步触发的概率分别为 $\langle P(\Delta t < \tau_l)\rangle(n_{\rm eff} = 30)$ $\equiv P_{\rm s}(n_{\rm eff} = 30)$ $= 95.5\%$ 和 $P_{\rm s}(n_{\rm eff} = 40)$ $= 98.9\%$。这一同步程度预测与定性的实验观察吻合良好，即在 *E. coli*中，DNA复制通常在多个复制起点同步起始。因此，我们的模型为实验观察到的高精度复制起始提供了合理解释。（所有参数见表 I。）

相当程度上独立于细胞的倍增时间 $\tau_{\rm d}$。

鉴于 $\langle s\rangle$ 随 τ_l 的变化基本不受生长速率影响，我们现在来考察 Skarstad 等人的数据 [9]。为了实验估算有效希尔系数，进而估算平均同步度，我们计算首次与末次起始事件之间的平均时间间隔 $\langle\Delta t\rangle$（见附录 VIII E），并将其与实验结果进行比较。Skarstad 等人发现，这一时间平均为 $\langle\Delta t_{\rm exp}\rangle \approx 3$ 分钟，上限为 $\Delta t_{\rm exp}^{\max} \approx 4$ 分钟 [9]。我们的理论预测，要在平均时间间隔为 $\langle\Delta t\rangle = 3-4$ 分钟内触发两个起始事件，有效希尔系数必须处于范围 $n_{\rm eff} = 29-38$ 内（图 4b，垂直灰色虚线）。有趣的是，$\langle\Delta t\rangle$ 对 $n_{\rm eff}$ 的依赖关系与起始体积变异系数（CV）的变化趋势密切一致（图 4b）。Skarstad 等人测得的$\langle\Delta t\rangle = 3-4$ 分钟对应于起始体积变异系数（CV）CV≈ $0.05-0.06$。这与实验发现相当吻合，即起始体积是一个是受调控最严格的细胞周期参数之一，其变异系数=0为 0.1 [2, 37]。参考文献[2] 测得变异系数为 0.1，对应于 $n_{\rm eff} \approx 20$ （图 4b，另见参考文献 [2]中的计算），因此同步程度相对较低，不到 $\langle s\rangle = 0.92$ ，相应的同步起始概率为$\langle P\ (\Delta t < \tau_l)\ \rangle \equiv P_{\rm s} = 84\%$（见公式 7）。然而，近期实验表明，复制起始中的内在噪声对变异系数的贡献仅约为变异系数$_{\rm int}$=0.04–0.05 [7]，，与 Skarstad 的数据（图 4b）更加吻合。我们的模型仅考虑内在噪声的影响，因此预测，对于如此低的变异系数$_{\rm int}$，有效希尔系数 $n_{\rm eff}$必须至少为 40（图 4b），这意味着至少有 $P_{\rm s}$ =98%的起始事件会在 10 分钟的时间段内同步发生，对应于$\langle s\rangle = 0.99$ （图 4a）。

在结束之前，我们必须讨论一个关键参数——最大放电率 $k_{\rm f}^0$。在我们的理论模型中，我们让 $k_{\rm f}^0$ 随 $n_{\rm eff}$ 变化，以保持每个复制起点的平均起始体积 $k_{\rm f}^0$ 不变，并使其等于式 5 中的 $k_{\rm f}^0$，遵循 Wallden 等人 $n_{\rm eff}$ 的方法。

图 VIII.6a 显示了我们的理论模型中 $\langle \Delta t \rangle$ 分别随 k_{f}^0 和 n_{eff} 变化的情况（因此未施加约束 $\langle v^* \rangle = v^*$）。尽管 $\langle \Delta t \rangle$ 随着 k_{f}^0 和 n_{eff} 的增加而增大，但要达到给定的 $\langle \Delta t \rangle$，n_{eff} 必须不低于某个最小值，这对应于极限 $k_{\mathrm{f}}^0 \to \infty$（见图 VIII.6a 插图）。达到与 Skarstadt 等人测量值相符的 $\langle \Delta t \rangle$ 所需的希尔系数，低于上述让 k_{f}^0 和 n_{eff} 共同变化的方法中的希尔系数（对应于图 VIII.6a 中的对角线），但仍然非常高，约为 $n_{\mathrm{eff}} \approx 20$（图 VIII.6a）。图 VIII.6b 显示，在这一极限下，$k_{\mathrm{f}}^0 \to \infty$ 和 $n_{\mathrm{eff}} = 20$，同步程度非常高，达到 $P_{\mathrm{s}} = 92\%$。因此，我们的随机复制起始模型为大肠杆菌中实验观察到的 DNA复制起始具有很高精确度提供了一种解释：考虑到阻断期持续时间所施加的约束，系统需要非常高的希尔系数才能同步启动复制。由于超过这一已经很大的数值后，进一步提高希尔系数会变得越来越困难，因此，系统似乎运行在由阻断期持续时间所决定的理论可能性上限附近。

IV Initiation synchrony in molecular activation switch model for 大肠杆菌

我们的复制起始粗粒化模型揭示了在多个复制起点同步起始复制所需的一般条件。然而，不同生物体如何在分子层面实现这些条件，仍是一个悬而未决的问题。在大肠杆菌中，要在所有生长速率下实现稳健的复制起始，蛋白质激活周期和浓度循环缺一不可 [26]。接下来，我们首先探讨一个问题：单靠蛋白质激活周期，也就是说，不借助浓度循环，能否实现同步复制？为此，我们将研究此前提出的所谓 LDDR 模型 [26] （图 5a）。该模型包含通过脂质以及染色体位点 DARS1/2 激活 DnaA，并通过染色体位点 datA 和复制相关机制——DnaA 调节性失活（RIDA） [26]——使 DnaA 失活。我们将证明，单靠这一循环也能诱导同步复制起始，但仅在非常有限的参数范围内。第二步，我们将证明，通过滴定位点加入浓度循环，能够显著提高同步程度。

为检验随机复制起点激活对 LDDR 模型的影响，我们将粗粒化模型中使用的抽象起始势$y(v)$替换为 LDDR 模型中的细胞 ATP-DnaA比例 $f(t)$。开放概率 $p_{\mathrm{o}}(f)$仍按方程 2 建模为简单的希尔函数。受实验观察启发，DnaA 与复制起点有 10 个结合位点 [13], , 希尔系数选为 $m = 10$；此外，方程 2 中的临界比例选为 $f^* = 0.5$。另外，将最大激活速率 k_{f}^0 设为较大值，即 $k_{\mathrm{f}}^0 = 1000\ \mathrm{h}^{-1}$，使系统处于这样的状态：同步程度不受 k_{f}^0限制，而仅受激活周期 $f(t)$的动力学限制。与粗粒化模型一样，已启动的复制起点在 τ_{b} =10 min 的阻断期内会暂时被阻断。与粗粒化模型不同，粗粒化模型中许可期结束后起始势会瞬间降至极低值；而在 LDDR 模型中，活性分数 f 由 DnaA 激活与失活之间拮抗作用的时间动力学决定。因此，LDDR 模型不像上述粗粒化模型那样人为设定许可期，而是将其隐含在模型动力学中。然而，为了量化同步程度，我们需要定义一个有效起始期 τ_{i}，与粗粒化模型中的许可期 τ_{l} 相对应（见方程 4 和 7）。我们将 τ_{i} 定义为细胞周期时间 τ_{d}的一部分：$\tau_{\mathrm{i}} = \alpha\, \tau_{\mathrm{d}}$。尽管无法唯一确定 α，我们在附录VIII F中表明，同步程度对 α的具体取值相当稳健。因此，在下文中我们选择 $\alpha = 0.4$，使得 $\tau_{\mathrm{i}} = 0.4\, \tau_{\mathrm{d}}$。

LDDR模型确实能够在多个复制起点实现同步复制起始，但仅适用于一小段参数范围：当（失）活因子 *DARS1*、*DARS2* 和*datA* 位于实验测得的染色体位置时，若RIDA在某个复制起点启动后立即开始作用，复制便会异步起始（图5b，$\tau_{\mathrm{rida}} = 0$ h）。由于RIDA是强效失活因子，它会使第一个复制起点起始后活性组分的比例迅速下降，从而阻止其他复制起点也启动。通过改变 *datA* 在染色体上的位置，以及某个复制起点启动后RIDA开始作用的时间，我们发现，在一小段参数范围内，LDDR模型可实现同步复制起始：当*datA* 的复制时间为实验测得的 $\tau_{\mathrm{datA}} = 0.13$h ≈ 8 min时，若RIDA的失活速率在复制起点启动 $\tau_{\mathrm{rida}} = 0.1$ h=6 min后升高，复制便会以较高的同步程度起始（图5b和c）。*datA* 位点越靠近复制起点，RIDA就应越晚开始作用，才能实现同步复制起始（图5b）。

然而，目前仍不清楚何种分子机制会导致RIDA的启动延迟约6分钟。在RIDA过程中，新合成DNA上的DNA聚合酶夹钳会与ADP和Hda蛋白形成复合物。由此产生的ADP-Hda-夹钳-DNA复合物能够结合ATP-DnaA，并促进ATP水解，生成ADP-DnaA [31, 32]。Hda的结合过程可能较慢，但这是否会造成约6分钟的延迟，远不明确。因此，在实验上现实的参数条件下，LDDR模型似乎不足以解释大肠杆菌中复制是如何同步启动的

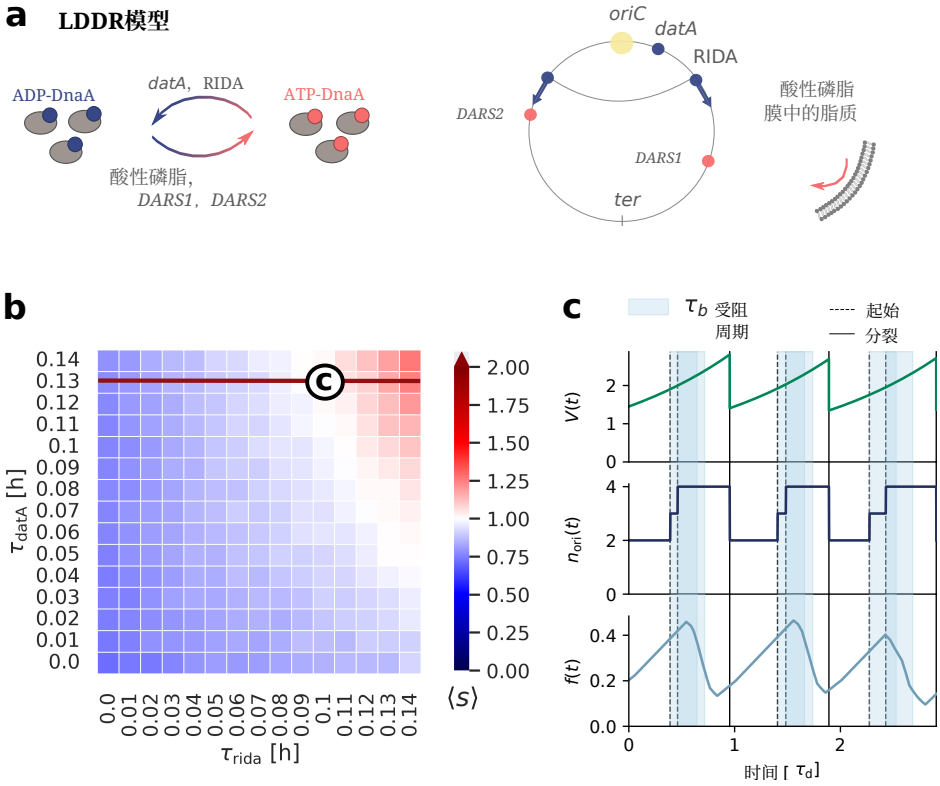

图 5. **LDDR模型仅在狭窄的参数范围内才能确保高度同步的复制起始。**(a) 在脂质-*DatA*-*DARS1/2*-RIDA（LDDR）模型中，复制叉相互重叠，RIDA与激活因子 *DARS1*和 *DARS2*共同发挥主要失活因子的作用。(b) 平均同步度 $\langle s\rangle$ 随位点 *datA* τ_{datA} 的复制时间和RIDA的起始时间 τ_{rida}变化。位点 *DARS1*和 *DARS2*分别在实验测得的 $\tau_{\mathrm{d1}} = 0.25$ 小时 $= 15$ 分钟和 $\tau_{\mathrm{d1}} = 0.4$ 小时 $= 24$ 分钟时复制。只有在较小的参数范围内，复制才会同步起始：当位点 *datA* 在实验测得的$\tau_{\mathrm{datA}} = 0.13$小时 ≈ 8 分钟后才复制（红色水平线）时，LDDR模型中的复制只有在RIDA于复制起点起始约6分钟后才开始的情况下，才会同步起始。然而，目前尚不清楚是什么因素可能导致RIDA的起始延迟6分钟。(c) 参数组合如(b)中所示时，体积 $V\ (t)$ 、复制起点数量 $n_{\mathrm{ori}}\ (t)$ 和ATP-DnaA比例 $f\ (t)$ 随时间（以细胞倍增时间 τ_{d}为单位）的变化。活性分数的大幅振荡，加上RIDA和 *datA* 介导的失活起始时间较长的延迟，可能在较小的参数范围内产生高度同步性。对于(b)中的每组参数，平均同步度均根据连续的$N = 5000$ 个细胞周期计算得出。（所有参数见表 I。）

在大肠杆菌。

V Titration can enhance the degree of synchrony of an activation switch

在大肠杆菌中，DNA复制起始不仅通过激活开关进行调控，也通过滴定[10, 11]进行调控。为了研究滴定对同步程度的影响，我们在LDDR模型中加入均匀分布于染色体上的滴定位点 [26]。在LDDR-滴定模型中，起始势由细胞中的游离ATP-DnaA浓度$[D]_{\mathrm{ATP,f}}$ 决定，而活性分数 f 和游离DnaA浓度$[D]_{\mathrm{T,f}}$ 的振荡都会参与调节复制起始。我们再次将复制起点的随机开放概率建模为希尔函数（方程2），其希尔系数为 $m = 10$。临界起始势 y^* 现在由临界游离ATP-DnaA浓度$[D]^*_{\mathrm{ATP,f}}$ 决定；在该浓度下，ATP-DnaA协同地结合到复制起点。这里我们忽略了结合在复制起点上的约10–20个DnaA蛋白对游离DnaA浓度的影响，因为其数量相对较少。如参考文献 [26], 所述，我们通过改变脂质激活速率 α_{l}来设定参数，使开关的起始体积 v^*_{s} 与滴定机制的起始体积 v^*_{t} 大致相同。这一最优选择确保游离浓度和活性分数都在相同的临界每个复制起点体积下升高，从而增大游离ATP-DnaA浓度振荡的幅度。

图6a/c展示了将滴定与激活开关相结合的模型的时间轨迹。细胞分裂时游离DnaA总浓度的小幅跃升，是以下因素共同作用的结果。首先，每个子细胞只会获得两条染色体中的一条

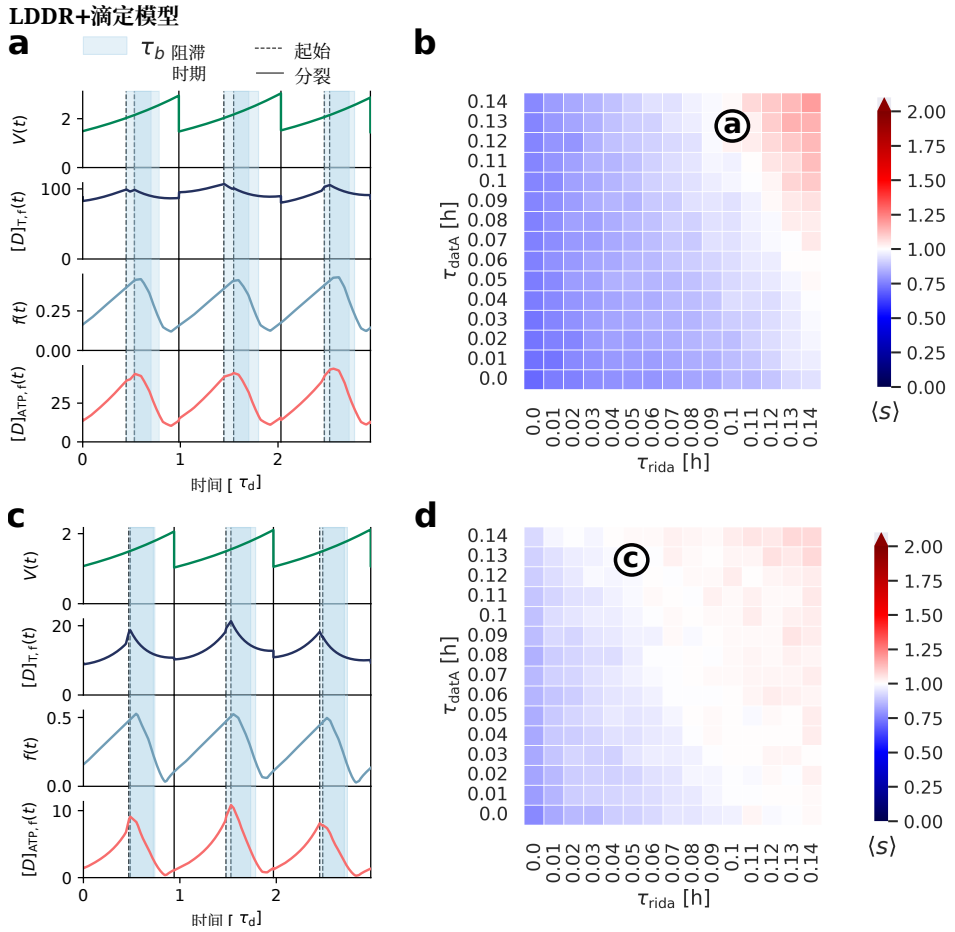

图 6. 在 LDDR 模型中加入滴定位点，可在临界游离 DnaA 浓度较低时增强起始同步性。(a, c) 在临界游离 ATP-DnaA 浓度为 $[D]^*_{\mathrm{f,ATP}} = 50\,\mu\mathrm{m}^{-3}$ (a) 和 $[D]^*_{\mathrm{f,ATP}} = 10\,\mu\mathrm{m}^{-3}$ (c) 时，体积 $V(t)$、游离 DnaA 浓度（与 DnaA 是否结合 ATP 或 ADP 无关）$[D]_{\mathrm{T,f}}(t)$、ATP-DnaA比例 $f(t)$ 和游离 ATP-DnaA浓度 $[D]_{\mathrm{ATP,f}}(t)$ 随时间的变化（时间单位为细胞倍增时间；$\tau_{\mathrm{d}} = 0.67\,\mathrm{h} = 40\,\mathrm{min}$）。在阻断期 τ_{b}（浅蓝色阴影区域），新复制的复制起点无法再次起始。(a) 当临界游离 ATP-DnaA 浓度相对较高时，游离 DnaA 浓度 $[D]_{\mathrm{T,f}}(t)$ 仅轻微振荡，并在新一轮复制起始后因新位点合成而略微下降。因此，游离 ATP-DnaA 浓度 $[D]_{\mathrm{ATP,f}}(t)$ 的振荡形态主要由 ATP-DnaA 比例 $f(t)$ 的振荡决定。(b, d) 对于 $[D]^*_{\mathrm{f,ATP}} = 50\,\mu\mathrm{m}^{-3}$ (b) 和 $[D]^*_{\mathrm{f,ATP}} = 10\,\mu\mathrm{m}^{-3}$ (d)，平均同步度 $\langle s \rangle$ 随位点 *datA* τ_{datA} 的复制时间和 RIDA τ_{rida} 的起始时间而变化。位点 *DARS1* 和 *DARS2* 分别在实验测得时间 $\tau_{\mathrm{d1}} = 0.25\mathrm{h} = 15\,\mathrm{min}$ 和 $\tau_{\mathrm{d1}} = 0.4\mathrm{h} = 24\,\mathrm{min}$ 复制。(b) 当临界游离 ATP-DnaA 浓度较高时，滴定位点对同步程度的影响很小，与不含滴定位点的情形几乎无法区分（参见图 5b）。(c) 临界游离 ATP-DnaA 浓度较低时，游离浓度的振荡幅度更大，从而使游离 ATP-DnaA浓度的振荡更加尖锐。这使得复制能够同步起始的参数范围更广 (d)。对于 b 和 d 中的每一组参数，平均同步度均根据连续 $N = 5000$ 个细胞周期计算得到。（所有参数见表 I。）

（图6a/c，第二个面板）。复制起点随机启动，导致各复制起点处的复制起始在时间上有所延迟。此外，在此处考虑的复制叉重叠的生长速率区间内，细胞分裂时并非所有染色体都已完成复制。综上，这意味着细胞分裂时，并非所有染色体都具有相同数量的滴定位点（这些位点均匀分布）。数量上的差异每条染色体上的滴定位点数量会导致细胞分裂时游离浓度发生轻微变化。

当启动DNA复制所需的临界游离ATP-DnaA浓度较高时，在LDDR模型中加入滴定位点对同步程度的影响很小。新一轮复制起始时，会产生新的滴定位点，游离DnaA浓度随之下降。正如 [26], 所讨论的，在生长速率较高、细胞中存在多条染色体时，新的

滴定位点的复制速率与新合成DnaA蛋白的速率相近。因此，滴定只会使游离DnaA总浓度产生轻微振荡（图6a）。如果启动DNA复制所需的临界游离DnaA浓度相对较高，游离DnaA浓度的振荡对起始潜能振荡的贡献就很小（图6a）。在这种情况下，将滴定加入LDDR模型不会显著改变同步程度、染色体上datA的最佳位置，也不会显著改变RIDA的最佳起始时间（比较图6b和图5b）。

然而，当游离DnaA浓度较低时，滴定可以显著提高LDDR模型的同步程度。将临界游离ATP-DnaA浓度设定为与滴定位点的亲和力相当的值，会增强游离DnaA浓度的振荡（图6c）。由此产生的游离ATP-DnaA浓度更陡峭的上升，使datA的所有位置以及RIDA起始时间下的同步程度都更高（图6c）。此时，以高同步程度启动复制的参数范围也扩展到了比LDDR模型中更短、更现实的RIDA起始时间（图6d）。总之，完整的滴定开关模型能够实现同步启动复制。

VI Discussion

细菌大肠杆菌 会在多个复制起点同步起始复制，且精确度很高。然而，它如何实现如此高的同步程度仍然未知。在本研究中，我们揭示了决定多个复制起点是否同步起始复制的若干普遍原则：（1）第一个复制起点启动后，起始势必须保持较高水平，使其余复制起点能够启动；（2）只要尚未所有复制起点都启动，就必须阻止已启动的复制起点立即再起始；这就需要一个阻断期；（3）在阻断期结束之前，起始势必须降低，以防止新复制的复制起点再起始。因此，复制起点能够启动的许可期必须短于阻断期。而阻断期最长只有 10 分钟 [12, 29, 30]，这意味着许可期必须短于 10 分钟。为了确保所有复制起点都在这一短暂的许可期内启动，起始势必须迅速升高；为了确保起始势在阻断期结束前再次降至较低水平，它也必须迅速下降。因此，同步复制起始需要起始势发生剧烈振荡。这种振荡也会导致起始体积出现小幅变化。因此，我们的结果预测，实验观察到的起始体积小幅变化，是同步复制起始这一要求所致。

我们证明，先前提出的细菌大肠杆菌 [26] 复制起始调控模型，在一系列与实验测量值相符的参数范围内，能够确保较高的起始同步性。我们发现，如果复制起始仅由蛋白质激活开关调控，那么为了确保同步复制起始，RIDA机制的最佳起始时间必须约为 6 分钟。由于 RIDA 与正在进行的复制相关联 [38]，而细胞中的蛋白质扩散通常以秒计而非以分钟计 [39] ，且 HdA 与复制夹的结合相当牢固 [31, 32], ，因此自然会认为，新一轮复制开始后，RIDA介导的失活会立即增强。不过，也可以设想 HdA浓度缓慢升高、HdA结合缓慢，或需要多个RIDA复合物才能使RIDA的失活速率显著增强 [31, 32]。在蛋白质激活开关中加入基于滴定位点的浓度循环，并使系统进入游离DnaA浓度在整个细胞周期内都保持较低的状态，可在广泛的参数范围内显著提高同步程度。重要的是，在组合模型中，即使RIDA的起始时间较短，复制起始仍具有较高的同步性。因此，将激活周期与浓度循环结合起来，很可能是大肠杆菌实现同步复制起始的关键。

延长阻断期是细胞提高同步程度的简便方法。然而，即使在生长速率极快、大肠杆菌的倍增时间约为20分钟时，阻断期也必须短于倍增时间，才能及时启动新一轮复制。这对阻断期的持续时间形成了自然限制。由于阻断期的持续时间对同步复制起始构成了严格约束，因此不禁使人推测，同步复制起始的要求限制了大肠杆菌的最大生长速率。

此外，其他生物，例如枯草芽孢杆菌 [3, 4], 耻垢分枝杆菌 [5] 和霍乱弧菌[6] ，也会在某些生长条件下同步起始多个染色体的复制。这些细菌在进化上彼此差异很大，控制复制起始的分子机制也各不相同。尽管如此，本文提出的同步复制起始一般原理应同样适用于这些生物。例如，虽然枯草芽孢杆菌 缺少SeqA蛋白，但它含有Spo0A蛋白；该蛋白可在体内抑制枯草芽孢杆菌噬菌体的复制起始 $\phi 29$ ，且已证明它能在体外与复制起点上的特定位点结合 [12]。这些实验表明，Spo0A与大肠杆菌中的SeqA类似，可通过直接结合枯草芽孢杆菌的复制起点区域来抑制染色体复制。

最后，我们没有对约 10–20 个 ATP-DnaA蛋白与复制起点的结合进行显式建模。不过，在所谓的“起始级联

模型”中，有人提出，在第一个复制起点启动复制可能会使其他复制起点也启动，因为结合的起始蛋白会释放到细胞质中 [40, 41]。由此产生的较高游离DnaA浓度可能使游离DnaA蛋白重新分配至其余复制起点，从而提高下一次复制起始事件发生的可能性 [40]。我们通过在模型中引入弱协同性复制起点结合位点来检验这一设想；这些位点仅能与 ATP-DnaA 结合。在这个扩展模型中，当细胞质中的 ATP-DnaA 浓度上升时，相应复制起点上的弱结合位点开始被占据，随后触发随机选定的一个复制起点启动复制（见附录 VIII G）。复制起始后，在阻断期内，已启动复制的复制起点上的结合位点将无法再与 DnaA 结合，从而导致游离DnaA浓度上升，这与参考文献 [40] 的预测一致。然而，我们发现 ATP-DnaA 与复制起点的结合会产生两种相反的效应：一方面，由于 ATP-DnaA蛋白释放，起始势确实会在首次起始事件后立即升高，使下一次起始事件更有可能发生（见图 VIII.3a 和 b）。另一方面，ATP-DnaA蛋白与复制起点结合，会使第一个复制起点启动复制之前游离DnaA浓度的上升不那么陡峭（见图 VIII.3a 和 b）。然而，在复制起始之前，起始势必须陡然升高，才能实现同步复制起始。因此，起始级联对同步程度的净效应近乎为零，我们也未发现同步程度有显著提高（见图 VIII.3c）。

VII Acknowledgements

感谢 Vahe Galstyan 富有成效的讨论和数学见解，也感谢 Lorenzo Olivi 启发性的讨论。我们感谢荷兰科学研究组织（NWO/OCW）引力计划“构建合成细胞”（BaSyC）（024.003.019）提供的资金支持。

VIII Appendix

A. 复制起点开放的粗粒化模型

我们将复制起点区域描述为一个二态系统，可在开放（O）或闭合（C）构型之间切换，其开放速率为 k_{o}，闭合速率为 k_{c}。若复制起点处于开放状态，复制即可按最大起始频率 k_{f}^{0}启动：

$$C \underset{k\mathrm{c}}{\overset{k_{\mathrm{o}}}{\rightleftharpoons}} O \xrightarrow{k_{\mathrm{f}}^{0}} I \tag{8}$$

在热平衡状态下，开放态和闭合态之间的转变速率之比由两种状态之间能量差的玻尔兹曼分布两种状态间能量差的曼分布：

$$\frac{k_{\mathrm{c}}}{k_{\mathrm{o}}} = \frac{e^{-\beta\, E_{\mathrm{c}}}}{e^{-\beta\, E_{\mathrm{o}}}} = e^{\beta\, \Delta G} \tag{9}$$

其中 $\beta = k_{\mathrm{B}}\, T$ 为激活势，能量差为

$$\Delta G = E_{\mathrm{o}} - E_{\mathrm{c}} \tag{10}$$

其中 E_{o} 为开放状态的能量， E_{c} 为闭合状态的能量。处于开放状态的概率随能量差 ΔG 变化，其表达式为

$$p_{\mathrm{o}} = \frac{e^{-\beta\, E_{\mathrm{o}}}}{e^{-\beta\, E_{\mathrm{o}}} + e^{-\beta\, E_{\mathrm{c}}}} = \frac{1}{1 + e^{\beta\, \Delta G}} \tag{11}$$

假设复制起点的开放和闭合动力学很快，则复制起点激活速率由方程 3 给出。细胞中的起始势 f 越高，复制起点越可能处于开放状态，复制也越可能启动。我们通过一种现象学模型描述这一观察：假设开放概率 p_{o} 随激活势 f 增加，并遵循希尔函数（见方程 2）。

B. 开放概率近似式的推导

我们希望找到开放概率 p_{o} 的解析表达式，因此也希望找到瞬时起始速率 k_{f} （方程 3）随时间变化的解析表达式。因此，将方程 1 代入方程 2，得到：

$$p_{\mathrm{o}}(f(v)) = \frac{v^{n\,m}}{f^{*\,m}\,(v^{*\,n} + v^{n})^{m} + v^{n\,m}} \tag{12}$$

$$= \frac{v^{n\,m}}{f^{*\,m}\, v^{*\,n\,m}\,(1 + \tilde{v}^{n})^{m} + v^{n\,m}}, \tag{13}$$

其中我们使用了 $\tilde{v} = v/v^{*}$。根据二项式公式，可以写成

$$(1 + \tilde{v}^{n})^{m} = \sum_{k=0}^{m} \binom{m}{k} 1^{k}\, (\tilde{v}^{n})^{m-k} \tag{14}$$

$$= \sum_{k=0}^{m} \binom{m}{k} (\tilde{v}^{n})^{m-k}. \tag{15}$$

其中二项式系数为

$$\binom{m}{k} \coloneqq \frac{m!}{k!\,(m-k)!}. \tag{16}$$

我们引入平移参数 $k' = k - m/2$，使得方程 15 可以改写为：

$$(1 + \tilde{v}^{n})^{m} = \sum_{k'=-m/2}^{m/2} \binom{m}{k' + \frac{m}{2}} (\tilde{v}^{n})^{\frac{m}{2} - k'}. \tag{17}$$

参数	name	值	动机
n	起始势能的希尔系数	5	设置为与报告的起始精度相匹配在 [14]中
v^* [μ米^3]	每个复制起点的起始体积	1	设定为与报告的起始体积相匹配在 [14]中
m	开启概率的希尔系数	10	[13]
y^*	临界起始势	0.5	设为 开口的最大锐度概率
K_{D} [$\mu\mathrm{m}^{-3}$]	（去）激活剂的解离常数	5	[23]
α_{l} [l] [$\mu\mathrm{m}^{-3}$ h^{-1}]	脂质激活速率	LDDR:500, LDDR+滴定:800	设为与报告的起始体积相匹配在 [14]中
β_{datA} [小时$^{-1}$]	失活速率 *datA*	600	[16]
τ_{datA} [小时]	复制时间 *datA*	0.13	[16]
f^*	临界起始子比例	0.5	[18, 25]
τ_{i} [小时]	起始持续时间	0.27	见图 VIII.2
α_{d1} [小时$^{-1}$]	激活速率 *DARS1*	100	[13, 17]
τ_{d1} [小时]	复制时间 *DARS1*	0.4	[13]
α^+_{d2} [h^{-1}]	高激活速率 *DARS2*	600	结合 β_{rida}
α^-_{d2} [小时$^{-1}$]	低激活速率 *DARS2*	50	设为任意低值
τ_{d2} [小时]	复制时间 *DARS2*	0.25	[17]
τ^+_{d2} [h]	高激活速率开始 *DARS2*	0.2	[17]
τ^-_{d2} [h]	高激活速率结束 *DARS2*	2/3	[17]
β_{rida} [h^{-1}]	RIDA失活速率	500	[16, 32, 42]
$[D]_{\mathrm{T}}$ [$\mu\mathrm{m}^{-3}$]	DnaA总浓度	400	[20, 22]
ϕ_0	基因分配比例	4×10^{-4}	设为与 $[D]_{\mathrm{T}}$匹配
$K^{\mathrm{s}}_{\mathrm{D}}$ [$\mu\mathrm{m}^{-3}$]	滴定位点解离常数	1	[23]
$n^{\mathrm{s}}_{\mathrm{ori}}$	复制起点结合位点数	10	[13]
$[D]^*_{\mathrm{ATP,f}}$	临界游离 ATP-DnaA 浓度	10	[23]
ρ [μ米$^{-3}$]	数密度	10^6	[43]
k^0_{f} [秒$^{-1}$]	最大复制起点起始速率	1000	设置为使同步程度达到最大
τ_{b} [小时]	阻断期	0.17	[28–30]
λ [h^{-1}]	生长速率	1.04	[2, 3]
T_{C} [h]	C期	2/3	[8]
T_{D} [h]	D周期	1/3	[8]

表 I. **模拟中使用的参数**每立方微米一个分子约等于 1 nM（1 $\mu\mathrm{m}^{-3} = 1.67$ nM）。

分别考察方程 17 中求和的第一项和第二项后，我们发现二项式系数在 $k' = 0$ 处达到最大值，并在 $k' \neq 0$ 时迅速衰减（见图 VIII.1a）。其次，如图 VIII.1b 所示，当 $k' \ll \pm m/2$ 较小且希尔系数 m足够大时，第二项近似为

$$\tilde{v}^{n\,(\frac{m}{2}-k')} \approx \tilde{v}^{\frac{mn}{2}}. \tag{18}$$

结合这两项观察，我们可以将方程 17 近似为

$$(1+\tilde{v}^n)^m \approx \sum_{k'=-m/2}^{m/2} \binom{m}{k'+\frac{m}{2}} \tilde{v}^{\frac{mn}{2}}. \tag{19}$$

最后，利用这一点

$$\sum_{k'=-m/2}^{m/2} \binom{m}{k'+\frac{m}{2}} = 2^m, \tag{20}$$

我们发现

$$(1+\tilde{v}^n)^m \approx 2^m\,\tilde{v}^{\frac{mn}{2}} \tag{21}$$

将此表达式代入方程 13，得到

$$p_{\mathrm{o}}(v) \approx \frac{v^{n\,m}}{f^{*\,m}\,v^{*\,n\,m}\,2^m\,\tilde{v}^{\frac{mn}{2}} + v^{n\,m}} \tag{22}$$

$$= \frac{v^{n\,m}}{f^{*\,m}\,2^m\,v^{*\,\frac{nm}{2}}\,v^{\frac{mn}{2}} + v^{n\,m}} \tag{23}$$

$$= \frac{v^{\frac{nm}{2}}}{f^{*\,m}\,2^m\,v^{*\,\frac{nm}{2}} + v^{\frac{nm}{2}}} \tag{24}$$

对于 $f^* = 0.5$，我们便得到正文中的方程 5，其中有效希尔系数为 $n_{\mathrm{eff}} = n\,m/2$。通过比较方程 5 中 $p_{\mathrm{o}}(v)$ 的近似表达式与函数

$$p^{\mathrm{fit}}_{\mathrm{o}}(v) = a^{\mathrm{fit}}\,\frac{v^{n^{\mathrm{fit}}_{\mathrm{eff}}}}{v^{*\,n^{\mathrm{fit}}_{\mathrm{eff}}} + v^{n^{\mathrm{fit}}_{\mathrm{eff}}}} \tag{25}$$

拟合到 $p_{\mathrm{o}}(f(v))$（方程 13）的结果表明，对于足够大的希尔系数，方程 5 中的近似确实是一个很好的近似——

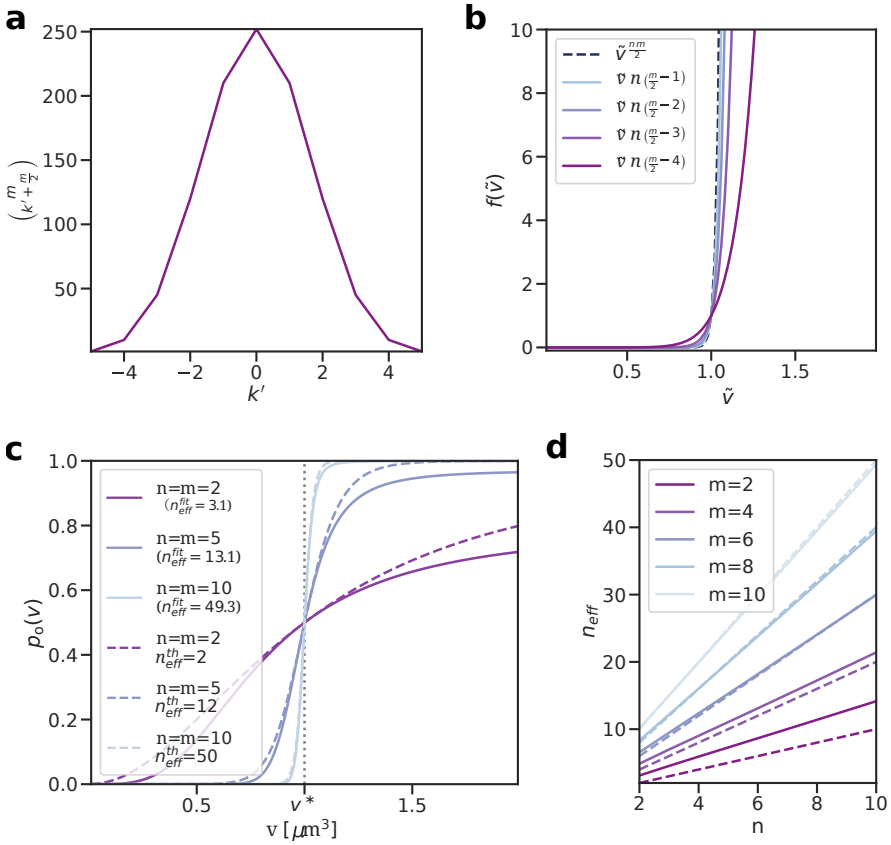

图 VIII.1. **瞬时开放概率可以用具有有效希尔系数的希尔函数近似表示**(a) 根据方程 16 定义的二项式系数随指标 k' 的变化，$m = 10$。二项式系数以 $k' = 0$ 为中心并在此处达到最大值，而当 $k' \gg 0$时则变小。(b) 方程 17 中第二项在指标 k' 取不同值时随重标度体积 $\tilde{v} = v/v^*$的变化。对于较小的 k'值，方程 17 中的第二项可用项 $\tilde{v}^{\frac{n}{2}m}$(蓝色虚线)很好地近似。(c) 复制起点 $p_o(f(v))$ 的开放概率(方程 13)随每个复制起点的体积 v的变化，不同希尔系数 n和 m对应实线。有效希尔系数 $n_{\text{eff}}^{\text{fit}}$通过将函数 $p_o(f(v))$ 拟合到希尔函数 (方程 25) 得到。虚线表示采用方程 6 所定义的有效希尔系数得到的近似开放概率 (方程 5)。竖直点线表示每个复制起点的临界体积 v^*，此时开放概率等于 1/2。(d) 拟合得到的(实线)和近似的(虚线，方程 6)希尔系数随希尔系数 n的变化，不同的希尔系数 m对应不同曲线。除希尔系数 n和 m非常低的情况外，近似希尔系数与拟合值吻合良好。所有图中均有 $f^* = v^* = 0.5$。(所有参数见表 I。)

尤其是在体积接近临界体积 v^* 时，对于足够大的希尔系数 n和m，这一近似效果很好（图 VIII.1c）。事实上，在较宽的希尔系数范围内，拟合得到的希尔系数与方程 6 中近似得到的希尔系数吻合良好，分别对应 n 和 m（图 VIII.1d）。

C. 最大触发速率的参数选择

结合开孔概率关于每个复制起点的体积的近似表达式（方程 5）、指数增长的细胞体积 $V(t) = V_{\text{b}}\, e^{\lambda t}$，以及触发速率的表达式（方程 3），我们得到单个复制起点：

$$k_{\text{f}}(t) = k_{\text{f}}^0 \frac{\left(V_{\text{b}}\, e^{\lambda t}\right)^{n_{\text{eff}}}}{v^{*\,n_{\text{eff}}} + \left(V_{\text{b}}\, e^{\lambda t}\right)^{n_{\text{eff}}}} \tag{26}$$

根据这一速率，我们可以计算存活概率

$$S(t) = e^{-\int_{t_0}^{t} dt' k_{\text{f}}(t')} \tag{27}$$

$$= e^{-\frac{k_{\text{f}}^0}{n_{\text{eff}}\lambda} \ln\left(\frac{(V_{\text{b}}\, e^{\lambda t})^{n_{\text{eff}}} + v^{*\,n_{\text{eff}}}}{V_{\text{b}}^{n_{\text{eff}}} + v^{*\,n_{\text{eff}}}}\right)} \tag{28}$$

其中我们利用初始条件$S(t_0 = 0) = 1$求解了积分。现在我们规定，在每个复制起点的理论起始体积 $v(t = t^*) = v^*$处，存活概率恰好为 $S(t^*) = 0.5$。利用这一约束，可得到最大起始频率的如下表达式

率，它是有效希尔系数 n_{eff} 的函数：

$$k_{\text{f}}^{0}(n_{\text{eff}}) = \frac{n_{\text{eff}}\,\lambda\,\ln(2)}{\ln\left(\frac{2\,v^{*n_{\text{eff}}}}{V_{\text{b}}^{n_{\text{eff}}}+v^{*n_{\text{eff}}}}\right)} \tag{29}$$

此参数选择确保平均起始体积 $\langle v^{*}\rangle$ 为 v^{*}。

D. 同步程度理论预测的推导

下面，我们推导两个起始事件在时间间隔 τ_l内发生的概率的理论预测。这里假设两个触发事件在统计上相互独立，也就是说，在第一个起始事件发生于时间 t_1 之后、时间$t_1+\tau_l$之前，由第一个事件引起的复制起点数量变化不会影响第二个事件的触发。利用方程 26 中的触发速率，我们现在可以计算错误概率 S_{err}：在第一个事件发生于时间 t_1的条件下，第二个事件在第一个事件之后的时间 τ_{l} 内不会 发生的概率：

$$S_{\text{err}}(t_2-t_1>\tau_{\text{l}}|t_1) = e^{-\int_{t_1}^{t_1+\tau_{\text{l}}} dt' k_{\text{f}}(t')} \tag{30}$$

$$= e^{-\frac{k_{\text{f}}^{0}}{n_{\text{eff}}\,\lambda}\,\log\left(\frac{\left(V_{\text{b}}\,e^{\lambda\,(t_1+\tau_{\text{l}})}\right)^{n_{\text{eff}}}+v^{*\,n_{\text{eff}}}}{\left(V_{\text{b}}\,e^{\lambda\,t_1}\right)^{n_{\text{eff}}}+v^{*\,n_{\text{eff}}}}\right)} \tag{31}$$

对第一个事件的所有起始时间 t_1取平均后，平均错误概率 $\langle S_{\text{err}}\rangle$ 为

$$\langle S_{\text{err}}\rangle = \int_0^{\tau_{\text{d}}} dt_1\, q_1(t_1)\, S_{\text{err}}(t_2-t_1>\tau_{\text{l}}|t_1) \tag{32}$$

$$= \int_0^{\tau_{\text{d}}} dt_1\, q_1(t_1)\, e^{-\int_{t_1}^{t_1+\tau_{\text{l}}} dt' k_{\text{f}}(t')} \tag{33}$$

其中， τ_{d} 是细胞的倍增时间。在时间t_1 发生两个复制起点事件之一的倾向率$q_1(t_1)$为

$$q_1(t_1) = 2\,k_{\text{f}}(t_1)\,e^{-\int_{t_0}^{t_1} dt' 2\,k_{\text{f}}(t')} \tag{34}$$

因此，将表达式 34 代入方程 33，可得第一个事件发生后经过时间 τ_{l} 时第二个复制起点启动的平均错误概率 $\langle S_{\text{err}}\rangle$：

$$\langle S_{\text{err}}\rangle = 2\int_0^{\tau_{\text{d}}} dt_1\, k_{\text{f}}(t_1)\, e^{-2\int_{t_0}^{t_1} dt' k_{\text{f}}(t')}\, e^{-\int_{t_1}^{t_1+\tau_{\text{l}}} dt' k_{\text{f}}(t')} \tag{35}$$

$$= 2\,k_{\text{f}}^{0}\int_0^{\tau_{\text{d}}} dt_1\, \frac{\left(V_{\text{b}}\,e^{\lambda\,t_1}\right)^{n_{\text{eff}}}}{v^{*\,n_{\text{eff}}}+\left(V_{\text{b}}\,e^{\lambda\,t_1}\right)^{n_{\text{eff}}}} \times e^{-\frac{2\,k_{\text{f}}^{0}}{n_{\text{eff}}\,\lambda}\,\ln\left(\frac{\left(V_{\text{b}}\,e^{\lambda\,t_1}\right)^{n_{\text{eff}}}+v^{*\,n_{\text{eff}}}}{V_{\text{b}}^{n_{\text{eff}}}+v^{*\,n_{\text{eff}}}}\right)} \times e^{-\frac{k_{\text{f}}^{0}}{n_{\text{eff}}\,\lambda}\,\ln\left(\frac{\left(V_{\text{b}}\,e^{\lambda\,(t_1+\tau_l)}\right)^{n_{\text{eff}}}+v^{*\,n_{\text{eff}}}}{\left(V_{\text{b}}\,e^{\lambda\,t_1}\right)^{n_{\text{eff}}}+v^{*\,n_{\text{eff}}}}\right)}, \tag{36}$$

其中， τ_{d} 是细胞的平均分裂时间，且$\tau_{\text{d}}\gg\tau_{\text{l}}$，使得在 τ_{d} 时两个复制起点均尚未启动的概率可以忽略不计。那么，第一个复制起点在 t_1 时启动后，第二个复制起点在时间间隔$\Delta t = t_2-t_1<\tau_{\text{l}}$ 内启动的平均概率为：

$$\langle P(\Delta t<\tau_{\text{l}})\rangle = 1-\langle S_{\text{err}}(\tau_{\text{l}})\rangle \tag{37}$$

我们对方程 36 中的积分进行数值求解，并使用表达式 7 预测两个复制起点的同步程度（见图 4b）。

在生长速率较高时，也可以解析地计算同步程度；此时，在起始级联开始时，每个细胞通常有四个或更多复制起点。给定第一个复制起点已在 t_1 时刻起始后，接下来的 τ_{l} 时间内， $n-1$ 个复制起点均未触发的概率与方程 36 类似，表示为

$$\langle S_{\text{err}}\rangle = n\int_0^{\tau_{\text{d}}} dt_1\, k_{\text{f}}(t_1)\, e^{-n\int_{t_0}^{t_1} dt' k_{\text{f}}(t')}\, e^{-(n-1)\int_{t_1}^{t_1+\tau_{\text{l}}} dt' k_{\text{f}}(t')} \tag{38}$$

这表示在第一个复制起点于 t_1 时刻起始的条件下，所有其他 $n-1$ 个复制起点均晚于 $t_1+\tau_{\text{l}}$ 时刻起始的概率。重要的是，现在还需要考虑只有一个或多个复制起点在 $t_1+\tau_{\text{l}}$ 起始，而其余复制起点更早起始的情况。此处不推导情形 $n>2$ 的表达式。

E. $\langle\Delta t\rangle$ 的理论预测推导及起始体积的变异系数

对于方程 5 中近似的开放概率，两个独立激活事件之间的平均时间间隔 $\langle\Delta t\rangle$ 可通过解析方法计算：

$$\langle\Delta t\rangle = \int_0^{\tau_{\text{d}}} dt_1 \int_{t_1}^{\tau_{\text{d}}} dt_2\, 2\,k_{\text{f}}(t_1)\,k_{\text{f}}(t_2)\,e^{-2\int_{t_0}^{t_1} dt' k_{\text{f}}(t')} \times e^{-\int_{t_1}^{t_2} dt'' k_{\text{f}}(t'')} \tag{39}$$

对该积分进行数值求解，得到图 4b 中的粉色曲线。

起始体积的理论变异系数 V 为：

$$CV = \frac{\sigma}{\mu} = \frac{\sqrt{\langle V^2\rangle-\langle V\rangle^2}}{\langle V\rangle} \tag{40}$$

其中我们使用

$$\langle V\rangle = \int_0^{\tau_{\text{d}}} dt\, k_{\text{f}}(t)\, e^{-\int_{t_0}^{t} dt' k_{\text{f}}(t')}\, V_{\text{b}}\, e^{\lambda\,t} \tag{41}$$

and

$$\langle V^2\rangle = \int_0^{\tau_{\text{d}}} dt\, k_{\text{f}}(t)\, e^{-\int_{t_0}^{t} dt' k_{\text{f}}(t')}\, \left(V_{\text{b}}\,e^{\lambda\,t}\right)^2 \tag{42}$$

在这一理论模型中，噪声的唯一来源是内在噪声，因此，方程 40 中的变异系数也对应于参考文献 [7]根据 Elowitz 等人 [44]的推导所定义的内在噪声。

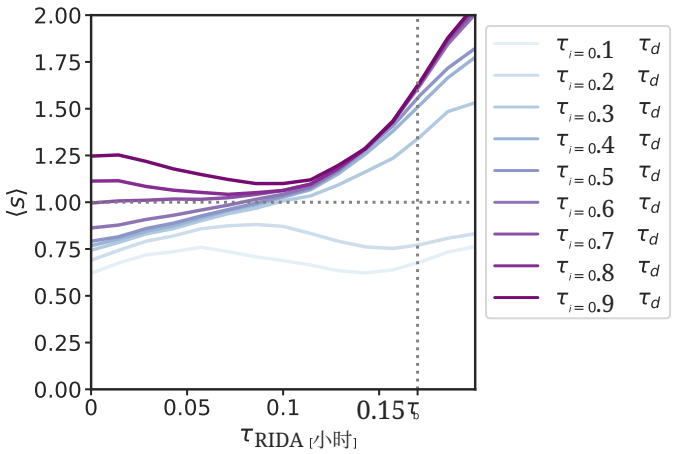

图 VIII.2. **平均同步度 $\langle s\rangle$ 在复制异步起始时强烈依赖于起始持续时间，但在复制同步起始时则不然。** 对于 LDDR 模型，平均同步度$\langle s\rangle$ 随 RIDA 起始时间 τ_{rida} 以及不同起始持续时间 τ_{i} （以倍增时间 τ_{d}为单位）的变化关系。同步程度 s 通过统计从第一个复制起点激活到起始持续时间结束期间的复制起点激活事件数量 τ_{i}得到。当所有复制起点在短时间间隔内（于 $\tau_{\mathrm{rida}}\approx 0.1$ h）同步起始时，平均同步度不会强烈依赖于起始期 τ_{i}。然而，当复制起点在整个细胞周期内异步起始时，平均同步度可能小于或大于 1，具体取决于持续时间 τ_{i}。在本文其余部分中，我们采用中等起始持续时间 $\tau_{\mathrm{i}}=0.4\,\tau_{\mathrm{d}}$。（所有参数见表 I。）

F. LDDR 和 LDDR-滴定模型中起始持续时间的定义

虽然同步参数无法被唯一地定义，但我们将定义一个参数来量化复制起始的同步程度，并说明结果对具体定义具有相当强的稳健性。具体而言，同步程度通过计算每个起始事件中的复制起点激活事件数来确定，其中起始持续时间 τ_{i} 是一个需要谨慎选择的参数（图3a）。在粗粒化模型中，起始事件始于第一个复制起点开始起始，结束于许可期结束。由于许可期结束后，起始潜能会瞬间降至极低水平，因此在粗粒化模型中，许可期结束后再次起始的可能性极低。然而，在 LDDR 模型中，RIDA 开始后且位点 $datA$ 完成加倍后，活性分数 f 并不会立即下降（图 5c）。因此，起始期应如何界定就不那么明确了。我们测试了改变起始持续时间 τ_{i} 对不同 RIDA 起始时间 τ_{rida} 下平均同步度 $\langle s\rangle$ 的影响（图 5）。在复制以非同步方式起始的参数区域中，平均同步度 $\langle s\rangle$ 会随起始持续时间发生显著变化：当 RIDA 起始时间 τ_{rida}极早时，复制起始不足（图 5b），但即便如此，在较长的起始持续时间 $\tau_{\mathrm{i}}>0.6\,\tau_{\mathrm{d}}$ 下，同步程度仍会大于 1（图 VIII.2）。起始持续时间 τ_{i} 越长，每个起始事件中计入的复制起点激活事件就越多，从而导致平均同步程度大于 1。相反，当 RIDA 起始过晚且复制起始过度时（图 5b），如果起始持续时间设得过短，同步程度仍可能小于 1。在 RIDA 的最佳启动时间，即 $\tau_{\mathrm{rida}}=0.1$ 小时 ≈ 6 分钟，复制起始具有同步性，此时起始持续时间的选择就不那么重要了：由于所有复制起点激活事件都发生在相对较短的时间窗口内，进一步延长起始持续时间并不会显著改变同步程度。只有当起始持续时间设得过短（$\tau_{\mathrm{i}}=0.2\,\tau_{\mathrm{d}}\approx 8$ 分钟）或过长（$\tau_{\mathrm{i}}=0.9\,\tau_{\mathrm{d}}\approx 36$ 分钟）时，平均同步程度才会小于或大于 1。因此，以下采用一个中等的起始持续时间：$\tau_{\mathrm{i}}=0.4\,\tau_{\mathrm{d}}\approx 16$ 分钟。

G. 起始级联模型

要启动DNA复制，8个ATP-DnaA蛋白和3个不受核苷酸结合状态影响的DnaA蛋白在复制起点处形成协同复合物，从而诱导构象变化并使复制起点打开 [13]。随后，DNA复制机制与开放的复制起点结合，并启动复制。复制起始后，结合在复制起点上的DnaA蛋白可能会释放到细胞质中，导致游离DnaA浓度短暂升高。有人提出，一个复制起点上结合的DnaA蛋白释放后，会触发其余复制起点的复制起始

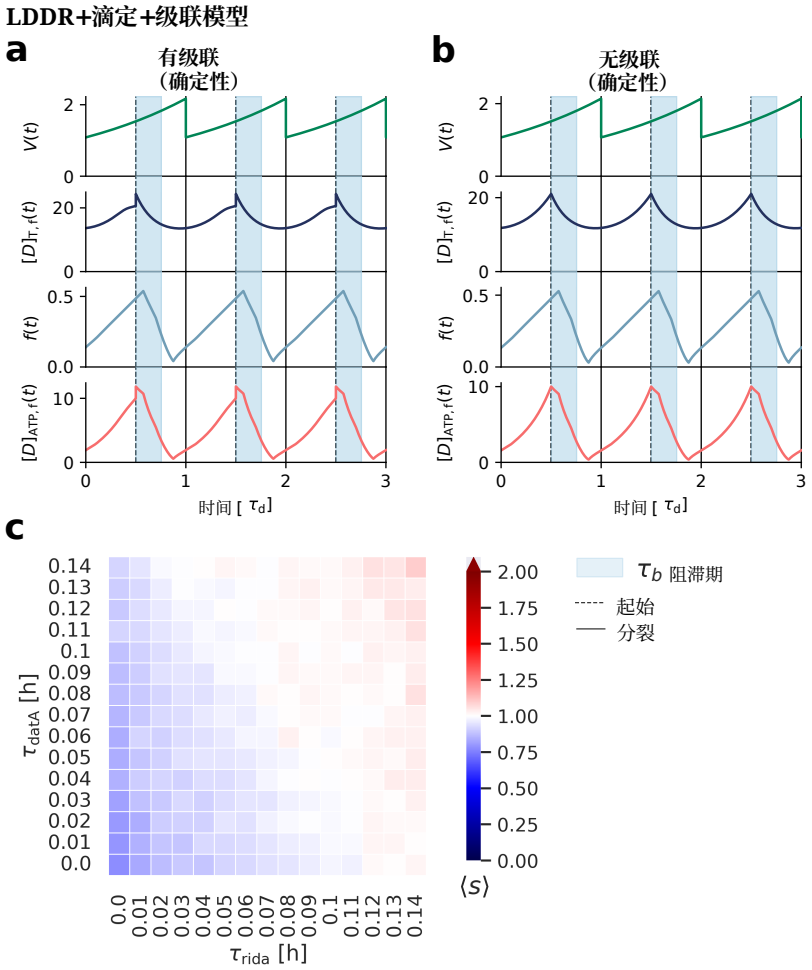

图 VIII.3. **起始级联并未显著提高同步程度**。(a、b) 体积 $V(t)$、游离 DnaA 浓度（不论 DnaA 与 ATP 还是 ADP 结合）$[D]_{\mathrm{T},\ \mathrm{f}}(t)$、ATP-DnaA比例 $f(t)$，以及游离ATP-DnaA浓度 $[D]_{\mathrm{ATP},\ \mathrm{f}}(t)$随时间的变化（时间单位为细胞倍增时间，即 $\tau_{\mathrm{d}} = 0.67$ h=40 min）；此处临界游离 ATP-DnaA 浓度为 $[D]^*_{\mathrm{f},\ \mathrm{ATP}} = 10\,\mu\mathrm{m}^{-3}$，有（a）和无（b）起始级联。为便于说明，复制在此设定为确定性过程：一旦细胞内达到临界游离 ATP-DnaA 浓度，所有复制起点便立即启动。（a）当游离 ATP-DnaA 浓度接近临界游离 ATP-DnaA 浓度 $[D]^*_{\mathrm{f},\ \mathrm{ATP}}$时，ATP-DnaA蛋白开始与较弱的协同性复制起点结合位点结合。这使得复制起始前游离 DnaA 浓度的上升速度减缓。复制起始后，已结合的 ATP-DnaA蛋白不再可用，导致游离 DnaA 浓度急剧上升。（b）作为比较，这里还展示了一个系统的时间轨迹；该系统未对复制起点结合位点进行显式建模，唯一的结合位点是均匀分布在整条染色体上的强DnaA盒。（c）平均同步度 $\langle s\rangle$ 随位点 $datA$ τ_{datA} 的复制时间和 RIDA 的起始时间 τ_{rida} 变化；参数与图 6d 相同。比较两个面板可见，起始级联并未显著提高同步程度。对于 c 中的每组参数，平均同步度根据 $N = 1000$ 个连续细胞周期计算得出。（所有参数见表 I。）

这一过程被称为“起始级联” [40]。在此，我们提出一个模型，用于检验一个复制起点启动复制后游离DnaA浓度的升高，是否足以触发其他复制起点的复制起始。

到目前为止，我们采用粗粒化方式对复制起点开放与激活过程进行建模，将复制起点的开放概率表示为起始势的希尔函数（见附录 VIIIA）。现在，我们改为对 ATP-DnaA 与复制起点的结合进行建模

通过在复制起点引入 ATP-DnaA蛋白的弱协同结合位点来明确体现。具体而言，我们忽略 ATP-DnaA 和 ADP-DnaA 均可结合的三个强结合位点，并假设存在 n 个弱结合位点，其解离常数为 $K_{\mathrm{D}}^{\mathrm{ori}}$，只有 ATP-DnaA 能在这些位点上协同结合。 n 个 ATP-DnaA蛋白结合到

复制起点的概率由下式给出

$$p_{\mathrm{b}}^{\mathrm{n}} = \frac{Z_{\mathrm{b}}^{\mathrm{n}}}{\sum_{i=0}^{N} Z_{\mathrm{i}}} \tag{43}$$

其中， $Z_{\mathrm{b}}^{\mathrm{n}}$ 是与复制起点结合的 n 蛋白的配分函数， $\sum_{i=0}^{N} Z_{\mathrm{i}}$ 是对复制起点可能处于的所有构型求和。首先考虑只有两个协同结合位点的情形。由此可得两个ATP-DnaA蛋白与复制起点结合的概率：

$$p_{\mathrm{b}}^{2} = \frac{Z_{\mathrm{b}}^{2}}{Z_{\mathrm{b}}^{0} + 2\,Z_{\mathrm{b}}^{1} + Z_{\mathrm{b}}^{2}} \tag{44}$$

未结合的ATP-DnaA蛋白的统计权重归一化为1 $Z_{\mathrm{b}}^{0} = 1$ ，一个ATP-DnaA蛋白结合时的权重为$Z_{\mathrm{b}}^{1} = [D]_{\mathrm{f,\ ATP}}/K_{\mathrm{D}}$, 其中解离常数为$K_{\mathrm{D}} = c_0^{-1}\, e^{-\beta\,\Delta G}$ ，游离ATP-DnaA浓度为$[D]_{\mathrm{f,\ ATP}}$。两个ATP-DnaA蛋白结合时的权重为 $Z_{\mathrm{b}}^{2} = w\,[D]_{\mathrm{f\ ATP}}^{2}/K_{\mathrm{D}}^{2}$ $w = e^{\beta\,\Delta E}$ ，

其中计入了两个ATP-DnaA蛋白协同结合所带来的额外能量增益。当协同结合非常强时， $\Delta E \gg \Delta G$ ，因此可以忽略 w的较低次幂项：

$$p_{\mathrm{b}}^{2} \approx \frac{Z_{\mathrm{b}}^{2}}{Z_{\mathrm{b}}^{0} + Z_{\mathrm{b}}^{2}} = \frac{w\,[D]_{\mathrm{f,ATP}}^{2}/K_{\mathrm{D}}^{2}}{1 + w\,[D]_{\mathrm{f,ATP}}^{2}/K_{\mathrm{D}}^{2}} = \frac{[D]_{\mathrm{f,ATP}}^{2}}{\left(\frac{K_{\mathrm{D}}}{\sqrt{w}}\right)^{2} + [D]_{\mathrm{f,ATP}}^{2}} \tag{45}$$

这个表达式可以推广到 nATP-DnaA与复制起点强协同结合位点的情形：

$$p_{\mathrm{b}}^{\mathrm{n}} \approx \frac{[D]_{\mathrm{f,ATP}}^{n}}{\left(\frac{K_{\mathrm{D}}}{\sqrt[n]{w}}\right)^{n} + [D]_{\mathrm{f,ATP}}^{n}} \tag{46}$$

因此，我们重新得到粗粒化模型中复制起点开放概率的表达式 2；此时，临界游离 ATP-DnaA 浓度为$[D]^{*}_{\mathrm{ATP,\ f}} = K_{\mathrm{D}}/\sqrt[n]{w}$。 —

为了计算 $[D]_{\mathrm{f}}$在以下情形中的游离DnaA浓度：DnaA的两种形式均可与染色体上均匀分布的300个强结合位点结合，而ATP-DnaA还可与复制起点上的 n 个弱结合位点协同结合，我们写出以下表达式

$$[D]_{\mathrm{f}} = [D]_{\mathrm{T}} - [D]_{\mathrm{s}} - [D]_{\mathrm{o}} \tag{47}$$

其中， $[D]_{\mathrm{T}}$ 是细胞中的DnaA总浓度，$[D]_{\mathrm{s}}$ 是滴定位点结合的DnaA浓度， $[D]_{\mathrm{o}}$ 是复制起点结合的ATP-DnaA浓度。根据准平衡近似，可得到滴定位点结合浓度 $[D]_{\mathrm{s}}$ 关于游离DnaA浓度$[D]_{\mathrm{f}}$ 的表达式，详见 [26]

$$[D]_{\mathrm{s}} = \frac{[s]_{\mathrm{T}}\,[D]_{\mathrm{f}}}{K_{\mathrm{D}}^{\mathrm{s}} + [D]_{\mathrm{f}}} \tag{48}$$

其中， $[s]_{\mathrm{T}}$ 是滴定位点总浓度， $K_{\mathrm{D}}^{\mathrm{s}}$是滴定位点的解离浓度。复制起点结合的ATP-DnaA浓度 $[D]_{\mathrm{o}}$ 等于 $p_{\mathrm{b}}^{\mathrm{n}}$ （即 n 个ATP-DnaA蛋白与复制起点结合的概率）乘以可与这些复制起点位点结合的蛋白质总浓度。该总浓度等于可供ATP-DnaA结合的复制起点浓度 $[n_{\mathrm{ori}}^{\mathrm{f}}]$ 乘以每个复制起点的结合位点数 n_{o}。因此，可得游离DnaA浓度的表达式如下：

$$[D]_{\mathrm{f}} = [D]_{\mathrm{T}} - \frac{[s]_{\mathrm{T}}\,[D]_{\mathrm{f}}}{K_{\mathrm{D}}^{\mathrm{s}} + [D]_{\mathrm{f}}} - \frac{n\,[n_{\mathrm{ori}}^{\mathrm{f}}]\,([D]_{\mathrm{f}}\,f)^{n}}{\left(\frac{K_{\mathrm{D}}}{\sqrt[n]{w}}\right)^{n} + ([D]_{\mathrm{f}}\,f)^{n}} \tag{49}$$

这里我们作了一个简化假设：游离ATP-DnaA浓度$[D]_{\mathrm{f,\ ATP}}$ 等于ATP-DnaA所占比例 f 乘以游离DnaA浓度 $[D]_{\mathrm{f}}$。这是一个合理的近似，因为复制起点结合位点的数量与DnaA蛋白总数及滴定位点总数相比都很少。因此，细胞中ATP-DnaA蛋白的总比例 f 近似等于细胞质中ATP-DnaA蛋白的比例。重要的是，如 [26], 中所述，我们假设开关组分对DnaA的（去）活化不受其结合状态影响，无论DnaA是结合在染色体上（滴定位点或复制起点位点），还是在细胞质中自由扩散。给定滴定位点总浓度 $[s]_{\mathrm{T}}$、DnaA总浓度 $[D]_{\mathrm{T}}$ 以及可供ATP-DnaA结合的复制起点位点总数$[n_{\mathrm{ori}}^{\mathrm{f}}]$后，我们在模拟的每个时间步长数值求解方程 49。每个复制起点再次以速率 $k_{\mathrm{f}} = k_{\mathrm{f}}^{0}\,p_{\mathrm{b}}^{\mathrm{n}}$随机地启动复制。我们通过在某个复制起点启动复制后，在 $\tau_{\mathrm{b}} = 10$ 分钟内暂时减少可用复制起点结合位点的数量，来模拟复制起始时DnaA蛋白释放到细胞质中的效应。

显式模拟 ATP-DnaA 与复制起点的结合，在广泛的参数范围内并未显著提高同步程度。当游离ATP-DnaA浓度升高并接近临界游离ATP-DnaA浓度 $[D]^{*}_{\mathrm{ATP,\ f}}$时，ATP-DnaA 开始协同地结合到复制起点结合位点上。与不含这些复制起点结合位点的系统相比，这会使复制起始前游离DnaA浓度的升幅减弱（图 VIII.3a 和 b）。复制起点起始后，其结合位点变得不可用，导致复制起始后游离DnaA浓度升高（图 VIII.3a 和 b）。虽然这一升高应能提高其他复制起点也启动复制的概率，但复制起始前游离浓度升幅减弱，会降低游离ATP-DnaA浓度上升的陡峭程度，因此应导致同步程度下降。事实上，将显式模拟复制起点结合的模拟（图 VIII.3c）与先前采用希尔函数描述开放概率的模型进行比较

（图 6d）可见，起始级联并未显著提高同步程度。原因是可能的情况是，起始级联的正向作用被复制起始前游离浓度上升幅度较小的负向作用所抵消。

[1] Isha H. Jain、Vikram Vijayan 和 Erin K. O'Shea。染色体的空间有序排列提高了蓝细菌染色体分配的准确性。 *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109 34 13638 13643, 2012 , ( ): – .

[2] Mats Wallden、David Fange、Ebba Gregorsson Lundius、¨Ozden Baltekin 和 Johan Elf。单个大肠杆菌细胞中复制周期与分裂周期的同步化。 *Cell*, 166(3):729–739, 2016。[3] Fangwei Si、Dongyang Li、Sarah E. Cox、John T. Sauls、Omid Azizi、Cindy Sou、Amy B. Schwartz、Michael J. Erickstad、Yonggun Jun、Xintian Li 和 Suckjoon Jun。大肠杆菌中起始质量的不变性及细胞大小的可预测性。 *Current Biology*, 27(9):1278–1287, 2017。[4] John T. Sauls、Sarah E. Cox、Quynh Do、Victo- ria Castillo、Zulfar Ghulam-Jelani 和 Suckjoon Jun。生理状态转变和扰动期间枯草芽孢杆菌复制起始的调控。 *mBio*, 10 6 02205 19, 2019 ( ):e – .[5] Isabella Santi、Neeraj Dhar、Djenet Bousbaine、Yuichi Wakamoto 和 John D. McKinney。分枝杆菌中染色体复制与细胞分裂周期的单细胞动力学。 *Nature Communications* 4 3 8, , (May): – .2013 [6] Elizabeth S Egan 、 Anders Løbner-Olesen 和 Matthew K Waldor。霍乱弧菌两条染色体的同步复制起始。 *CurrentBiology*, 14(13):501–502, 2004。[7]Thias Boesen、Godefroid Charbon、Haochen Fu、Cara Jensen、Dongyang Li、Suckjoon Jun 和 Anders Lobner-Olesen。在缺少 DnaA-ATP/DnaA-ADP调控元件的情况下，大肠杆菌复制起始的鲁棒控制。 *bioRxiv*, 2022。[8] Stephen Cooper 和 Charles E. Helmstetter。大肠杆菌的染色体复制与分裂周期。 *Journal of Molecular Biology*, 31(3):519–540, 1968年2月。[9] K. Skarstad、E. Boye 和 H. B. Steen。单个大肠杆菌细胞中染色体复制起始的时机。 *The EMBO journal*, 5(7):1711–1717, 1986。[10] F. G. Hansen、B. B. Christensen 和 T. Atlung。起始因子滴定模型：染色体与微型染色体控制的计算机模拟。 *Research in Mi-crobiology*, 142(2-3):161–167, 1991。[11] Flemming G. Hansen 和 Tove Atlung。DnaA的故事。 *Frontiers in Microbiology*, 9(2月):1–19, 2018。[12] Tsutomu Katayama、Shogo Ozaki、Kenji Keyamura 和 Kazuyuki Fujimitsu。复制周期的调控：DnaA和oriC保守且多样的调控系统。 *Nature Reviews Microbiology*, 8(3):163–170, 2010。[13] Tsutomu Katayama、Kazutoshi Kasho 和 Hironori Kawakami。大肠杆菌中的DnaA循环：起始蛋白的激活、功能与失活。*Frontiers in Microbiology*, 8(12月):1–15, 2017。.[14] Mats Wallden、David Fange、Ozden Baltekin 和 Johan Elf. 生长速率的波动决定大肠杆菌细胞的世代时间和大小分布，2015年。[15] Liselot Dewachter、Natalie Verstraeten、Maarten Fau- vart 和 Jan Michiels。《大肠杆菌细胞周期调控的整合性观点》。 *FEMS Microbiology Reviews*，42 2 116 136，2018年（ ）： –。[16] Kazutoshi Kasho 和 Tsutomu Katayama。DnaA结合位点 datA 促进 DnaA-ATP 水解，使复制起始与细胞周期相协调。 *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110 3 936 941, , ( ): –。2013 [17]Kazutoshi Kasho、Kazuyuki Fujimitsu、Toshihiro Matoba、Taku Oshima 和 Tsutomu Katayama。IHF 和 Fis 及时结合 DARS2，调控 ATP-DnaA生成和复制起始。 *Nucleic acids research* 42 21 13134 13149, 2014 , ( ): – 12月。[18]Kenji Kurokawa、Satoshi Nishida、Akiko Emoto、Kazuhisa Sekimizu 和 Tsutomu Katayama。大肠杆菌中 DnaA 蛋白腺嘌呤核苷酸结合形式的变化与复制周期相协调。 *The EMBO Journal* 18 23 6642 6652, 1999 , ( ): –。

[19]Satoshi Nishida、Kazuyuki Fujimitsu、Kazuhisa Sekimizu、Tadahiro Ohmura、Tadashi Ueda 和 Tsutomu Katayama。《大肠杆菌 DnaA 蛋白中的核苷酸开关启动染色体复制》。*The Journal of biological chemistry*，277 17 14986 14995，2002年（ ）： – 4月。[20] Christian Speck 和 Walter Messer。复制起点解旋机制：DnaA依次结合双链和单链DNA。 *EMBO Journal* 20 6 1469 1476, , ( ): –。2001 [21] Kenji Keyamura、Yoshito Abe、Masahiro Higashi、Tadashi Ueda 和 Tsutomu Katayama。DiaA动态变化与起始复制起点复合物的变化相耦合，并促使解旋酶装载。 *Journal of Biological Chemistry*，284 37 25038 25050，2009年（ ）： –。[22] F. G. Hansen、T. Atlung、R. E. Braun、A. Wright、P. Hughes 和 M. Kohiyama。大肠杆菌和鼠伤寒沙门氏菌中起始蛋白（DnaA）的浓度与生长速率的关系。 *Journal of Bacteriology* 173 16 5194 5199, 1991 , ( ): –。

[23] Sigrid Schaper 和 Walter Messer。大肠杆菌起始蛋白 DnaA 与其 DNA靶位点的相互作用。 *Journal of Biological Chemistry*，270(29):17622–17626，1995年。[24] Kazuyuki Fujimitsu、Takayuki Senriuchi 和 Tsutomu Katayama。大肠杆菌的特定基因组序列通过直接重新激活 ADP-DnaA 促进复制起始。 *Genes and Development*，23(10):1221–1233，2009年。[25]Tsutomu Katayama、Kazuyuki Fujimitsu 和 Tohru Ogawa。大肠杆菌中调控 DnaA功能的多种途径：datA位点对 DnaA滴定的作用与 DnaA的调节性失活各不相同。*Biochimie*，83(1):13–17，2001年。[26] Mareike Berger 和 Pieter Rein ten Wolde。耦合的稳态机制实现稳健的复制起始。

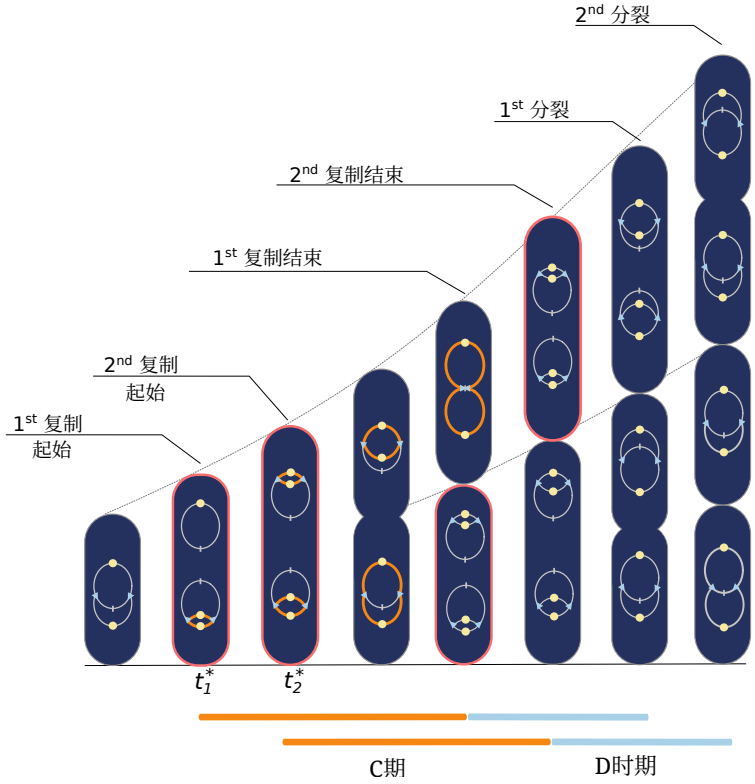

图 VIII.4. **大肠杆菌细胞周期示意图，**展示了**每次复制起点激活事件如何在固定的循环时间后触发细胞分裂。** 当倍增时间短于复制整个染色体并完成分裂所需的时间（C+D 时期）时，细胞通常在出生时就已处于一轮染色体复制过程中。此处，我们展示了细胞周期开始时具有两个复制起点的生长速率区间中的复制起始。每个复制起点（黄色圆圈）分别在 t_1 和 t_2时随机地启动复制，复制叉（蓝色三角形）以恒定的复制速度向复制终止区（灰色横条）推进。在我们的模型中，每次起始事件都会在复制起始后的固定循环时间 $\tau_{\mathrm{cc}} = T_{\mathrm{C}} + T_{\mathrm{D}}$ 触发细胞分裂。这确保细胞不会在整个染色体复制完成之前分裂。请注意，“1st 分裂”（“2nd 分裂”）对应于母细胞中由“1st 复制起始”（“2nd 复制起始”）事件触发的分裂事件。

Nature Communications，13(1):6556，2022年11月。[27] Leise Riber、Jakob Frimodt-Møller、Godefroid Charbon 和 Anders Løbner-Olesen。多种DNA结合蛋白共同参与大肠杆菌染色体复制时机的调控。 *Frontiers in Molecular Biosciences*，3(6月):1–9，2016年。[28] J L Campbell 和 N Kleckner。大肠杆菌 oriC 和 dnaA基因启动子在染色体复制叉通过后受到隔离，无法被 Dam 甲基转移酶接触。 *Cell*，62(5):967–979，1990 年 9 月。[29] Min Lu、Joseph L. Campbell、Erik Boye 和 Nancy Kleckner。SeqA：大肠杆菌复制起始的负向调节因子。 *Cell*，77(3):413–426，1994年。[30] Torsten Waldminghaus 和 Kirsten Skarstad。大肠杆菌 SeqA 蛋白。

Plasmid 61 3 141 150, , (): –。2009

[31]Jun Ichi Kato 和 Tsutomu Katayama。Hda，一种新型 DnaA相关蛋白，可调控大肠杆菌的复制周期。

EMBO Journal 20 15 4253 4262, , (): –。2001

[32] Kenta Nakamura 和 Tsutomu Katayama。Hda 与 DnaA 相互作用所需的新型关键残基在 DnaA的调节性失活中具有独特作用：Hda AAA$^+$ Box VI 和 VII 基序。 *Molecular Microbiology*，76(2):302–317，2010年。[33] Risa Kitagawa、Hironobu Mitsuki、Tuneko Okazaki和Tohru Ogawa。大肠杆菌染色体94.7分钟处一个新型DnaA蛋白结合位点。 *Molecular Microbiology*，19(5):1137–1147，1996年。[34] Risa Kitagawa、Toru Ozaki、Shigeki Moriya和Tohru Ogawa。一个新型染色体位点对大肠杆菌DnaA蛋白具有极高亲和力，并对复制起始进行负调控。*Genes and Development* 12 19 3032 3043, 1998 , ( ): –。[35] Tohru Ogawa、Yoshitaka Yamada、Takao Kuroda、Tet- suya Kishi和Shigeki Moriya。datA位点主要通过起始蛋白滴定机制参与大肠杆菌复制起始的调控。 *Molecular Microbiology*，44(5):1367–1375，2002年。[36] Shingo Nozaki、Yoshitaka Yamada和Tohru Ogawa。在IHF的帮助下于datA形成的起始蛋白滴定复合物可调控大肠杆菌的复制时序。*Genes to Cells*，14(3):329–341，2009年。[37] Fangwei Si、Guillaume Le Treut、John T. Sauls、Stephen Vadia、Petra Anne Levin和Suckjoon Jun。细菌细胞大小控制与稳态的机制起源。*Current Biology*，29(11):1760–1770.e7，2019年。[38]Tsutomu Katayama、Toshio Kubota、Kenji Kurokawa，

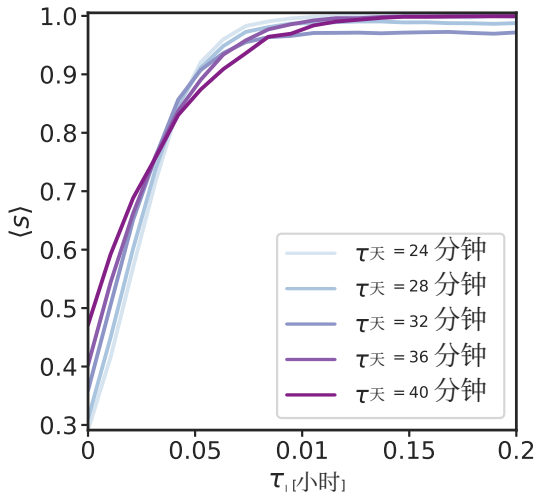

图 VIII.5. **平均同步度对细胞生长速率的依赖性不强**。不同细胞倍增时间 τ_{d} 下，平均同步度 $\langle s\rangle$ 随许可期持续时间 τ_{l} 的变化。平均同步度 $\langle s\rangle$ 在很大程度上独立于倍增时间 τ_{d}。在倍增时间为 $\tau_{\mathrm{d}}=32$ 分钟时，许可时间 τ_{l} 较长会导致同步程度略有下降，这是因为在该倍增时间下，复制起始几乎与细胞分裂同时发生。如果细胞在起始级联过程中分裂，复制起点数量就会减少，因此在级联结束时统计的复制起点总数会少于两个子细胞中复制起点的总数。方程 4 中对复制起点总数变化 Δn_{ori} 的统计误差，实际上降低了同步程度；起始持续时间越长（许可时间 τ_{l} 越长），这种影响尤其明显。随着生长速率增加，最小平均同步度 $\langle s\rangle$（在 $\tau_{\mathrm{l}}=0$ 时）下降，这是因为较高生长速率下复制起点的总体数量更多，从而使方程 4 中的分母增大。有效希尔系数设为 $n_{\mathrm{eff}}=50$。（所有参数见表 I。）

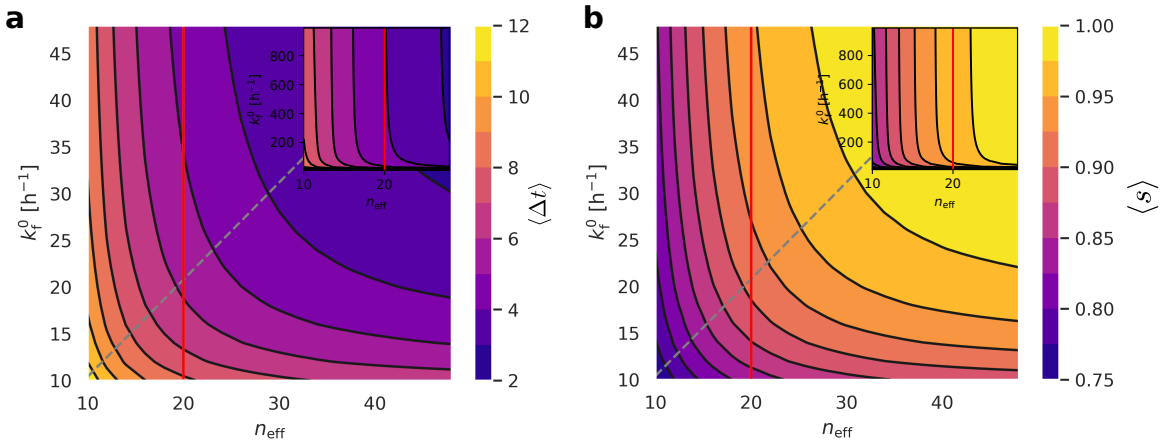

图 VIII.6. **在粗粒化模型中，首次与末次激活事件之间的平均时间间隔$\langle\Delta t\rangle$ 以及平均同步度 $\langle s\rangle$ 同时取决于有效希尔系数 n_{eff} 和最大放电率 k_{f}^0**。这些等高线图显示了在许可期为 $\tau_{\mathrm{l}}=9.6$ 分钟、实验观察到的阻断期为 $\tau_{\mathrm{b}}=10$ 分钟时，首次与末次复制起点激活事件之间的平均时间间隔$\langle\Delta t\rangle$ (a)和理论同步程度 s_{th}（根据方程 7）(b)随有效希尔系数n_{eff} 和最大放电率 k_{f}^0的变化。灰色虚线由方程 29 给出，对应于正文中所选的参数，此时平均起始体积为 $\langle v^*\rangle=v^*$（见附录 VIII C）。对于给定的希尔系数 n_{eff}，$\langle\Delta t\rangle$ 和 $\langle s\rangle$ 均随最大放电率 k_{f}^0增加而先增大，随后在最大放电率较高时趋于恒定值。因此，与图 4a 相比，在更高的最大复制起点起始速率下，可以采用较低的有效希尔系数来达到相同的同步程度。然而，图 a 显示（插图中更清楚），要达到实验报告的 $\langle\Delta t_{\mathrm{exp}}^{\mathrm{max}}\rangle$最大界限，$n_{\mathrm{eff}}$ 必须不低于某个最小值，对应于极限$k_{\mathrm{f}}^0\to\infty$。红色竖线表明，要在至少 $\langle\Delta t_{\mathrm{exp}}^{\mathrm{max}}\rangle=4$ 分钟内启动复制，在触发速率范围（$k_{\mathrm{f}}^0\to\infty$）内所需的最小希尔系数为 $n_{\mathrm{eff}}=20$。这对应于较高的同步程度 $s_{\mathrm{th}}\approx0.96$（相当于 $P_{\mathrm{s}}\approx92\%$）（见图 b）。因此，正文中关于高同步程度需要较高希尔系数的结论仍然成立。（所有参数见表 I。）

Elliott Crooke 和 Kazuhisa Sekimizu。DnaA蛋白的起始功能受到大肠杆菌染色体复制酶滑动夹的负向调控。 *Cell*，94 1 61 71，1998（）：–。[39] Johan Elf、Gene-Wei Li 和 X. Sunney Xie。在活细胞中以单分子水平探测转录因子的动态变化。 *Science*，316(5828):1191–1194，2007。[40] Anders Løbner-Olesen、Flemming G. Hansen、Knud V. Rasmussen、Brad Martin 和 Peter L. Kuempel。野生型和Dam甲基转移酶缺陷型大肠杆菌细胞中染色体复制的起始级联。 *EMBO Journal*，13(8):1856–1862，1994。[41] John Herrick、Masamichi Kohiyama、Tove Atlung 和 Flemming G. Hansen。起始之谜？ *Molecular Microbiology*，19(4):659–666，1996年。[42] M. Charl Moolman、Sriram T.iruvadi Krishnan、Ja- cob W.J. Kerssemakers、Aafke van den Berg、Pawel Tulinski、Martin Depken、Rodrigo Reyes-Lamothe、David J. Sherratt 和 Nynke H. Dekker。缓慢卸载导致活大肠杆菌细胞中与 DNA 结合的 β2-滑动夹积累。 *Nature communications*，5:5820，2014年。[43] Ron Milo。每单位细胞体积的蛋白质分子总数是多少？呼吁重新思考一些已发表的数值。*BioEssays*，35(12):1050–1055，2013年。[44] Michael B. Elowitz、Arnold J. Levine、Eric D. Siggia 和 Peter S. Swain。单个细胞中的随机基因表达。*Science*，297(5584):1183–1186，2002年。