View metadata, citation and similar papers at core.ac.uk
brought to you by CORE
provided by Directory of Open Access Journals

Biological Journal of Microorganism, 7th Year, No. 27, Autumn 2018

# *Expression of RecF and GyrB Genes in a Low Ciprofloxacin-resistant Escherichia coli* Mutant

**Marzieh Sadat Moosavi**
Msc Student-Dept of Genetics, Faculty of Science, Shahrekord Univ. Shahrekord,Iran, marzieh.sadat7112@gmail.com
**Razieh Pourahmad** *
Associate professor of Genetics, Faculty of Science, Shahrekord University Iran, razieh_jaktaji@yahoo.com
**Mohammad Reza Mahzoonieh**
Prof. of veterinary microbiology, Dept. of Pathbiology, Faculty of Veterinary-Shahrekord Univ.Shahrekord, Iran, mahzoon2@yahoo.com

## Abstract

**Introduction:** Replication and recombination are two fundamental cellular processes. GyrB and RecF are two proteins that are involved in these processes, respectively. GyrB is a subunit of DNA gyrase, the enzyme maintains negative supercoil in genomic DNA. RecF helps to load RecA in a single-strand gap, which is then repaired by RecA. Genes encoding these proteins are located in the same operon. Besides the general promoter, which is used in logarithmic phase, RecF has its own promoter, which is activated in stationary phase. The aims of this study were to investigate the expression of these genes and to estimate the pattern of *RecF* expression in the presence of ciprofloxacin.

**Materials and Methods:** RNAs of the cells were first extracted in logarithmic phase and after cDNA synthesis, the relative expression of these genes was determined in the *E. coli* mutant with low resistance to ciprofloxacin by Real-Time PCR.

**Results:** Results showed that both genes are overexpressed similarly in the mutant cell treated with a low amount of ciprofloxacin in the exponential phase of growth.

**Conclusion:** The present work revealed that the variety and the number of the Cyanobacteria in this desert area are dependent on different parameters such as weather, humidity, source of nutrients, the amount of light absorbed by the surface and the temperature. The results of molecular identification validated the results of morphological tests.

**Key words:** *RecF*, *GyrB*, Ciprofloxacin, *Escherichia coli*.

* Corresponding author
**Received:** March 03, 2018 / **Accepted:** June 11, 2018

فصلنامه علمی- پژوهشی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال هفتم، شماره ۲۷، پاییز ۱۳۹۷، صفحه ۶۰- ۵۳
تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۲/۱۲ – تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۳/۲۱

# بیان ژن‌های *recF* و *gyrB* در جهش‌یافتهٔ *اشریشیا کلی* با مقاومت کم به سیپروفلوکساسین

**مرضیه سادات موسوی:** دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه ژنتیک، دانشکدهٔ علوم، دانشگاه شهرکرد، ایران، marzieh.sadat7112@gmail.com
**راضیه پوراحمد** *: دانشیار ژنتیک، گروه ژنتیک، دانشکدهٔ علوم، دانشگاه شهرکرد، ایران، razieh_jaktaji@yahoo.com
**محمدرضا محزونیه:** استاد میکروبیولوژی دامپزشکی، گروه پاتوبیولوژی، دانشکدهٔ دامپزشکی، دانشگاه شهرکرد، ایران، mahzoon2@yahoo.com

## چکیده

**مقدمه:** همانندسازی و نوترکیبی دو فرایند اساسی سلولی هستند و GyrB و RecF دو پروتئین هستند که به‌ترتیب در فرایندهای یادشده شرکت می‌کنند. GyrB زیرواحد آنزیم DNAجیراز است؛ آنزیمی که ابرپیچش منفی در DNA ژنومی را حفظ می‌کند. RecF به سوارشدن RecA در شکاف تک‌رشته کمک می‌کند و بعداً RecA تک‌رشته را ترمیم می‌کند. ژن‌های کدکنندهٔ این پروتئین‌ها در یک اپرون قرار دارند. علاوه‌بر پروموتر عمومی که در فاز نمایی استفاده می‌شود، RecF دارای پروموتر خودی است که در فاز رکود فعال می‌شود. هدف مطالعهٔ حاضر بررسی بیان این ژن‌ها و پیشگویی الگوی بیان RecF در حضور سیپروفلوکساسین است.

**مواد و روش‌ها:** ابتدا RNA سلول‌ها در فاز نمایی استخراج و پس‌از سنتز cDNA، بیان نسبی ژن‌های *recF* و *gyrB* در جهش‌یافتهٔ اشریشیا کلی دارای مقاومت کم به سیپروفلوکساسین به روش Real Time PCR ارزیابی شد.

**نتایج:** نتایج نشان دادند هر دو ژن یادشده به‌طور مشابه در فاز نمایی سلول جهش‌یافتهٔ تیمارشده با مقدار کم سیپروفلوکساسین بیش‌بیان می‌شوند.

**بحث و نتیجه‌گیری:** طبق نتایج، سیپروفلوکساسین بیش‌بیان ژن‌های یادشده را القا می‌کند؛ هرچند سطح مشابه بیان ممکن است رونویسی RecF توسط پروموتر خودی را پیشنهاد نکند و در نتیجه RecF برای ترمیم آسیب ناشی از سیپروفلوکساسین لازم است؛ هرچند حیات سلول به‌طور کامل وابسته به این پروتئین نیست.

**واژه‌های کلیدی:** *recF*، *gyrB*، سیپروفلوکساسین، اشریشیا کلی

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات

Copyright©2018, University of Isfahan. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/BY-NC-ND/4.0/), which permits others to download this work and share it with others as long as they credit it, but they cannot change it in any way or use it commercially.

**مقدمه**

کینولون‌ها و فلوروکینولون‌ها کلاس نسبتاً جدیدی از آنتی‌بیوتیک‌های مصنوعی با فعالیت ضدباکتریایی قوی و طیف اثر گسترده در برابر بسیاری از بیماری‌زاهای مهم هستند (۱). سیپروفلوکساسین یکی از موفق‌ترین و گسترده‌ترین فلوروکینولون‌های استفاده‌شده است (۲). این گروه از آنتی‌بیوتیک‌ها مانع فعالیت DNAجیراز در باکتری‌های گرم منفی نظیر *اشریشیا کلی* می‌شوند (۳)؛ برای این منظور به آنزیم جیراز متصل به DNA که کمپلکس قابل‌شکست نامیده می‌شود (به‌علت وجود شکست در دو رشته) وصل می‌شوند و کمپلکس سه‌تایی ایجاد می‌کنند که مانع ادامهٔ رونویسی و همانندسازی DNA باکتری می‌شود. جداشدن آنزیم از کمپلکس باعث آزادشدن شکست دورشته‌ای می‌شود که چنانچه با فرایند نوترکیبی وابسته به RecB ترمیم نشود سبب مرگ سلول می‌شود؛ ازاین‌رو، RecB پروتئینی حیاتی برای سلول تیمارشده با سیپروفلوکساسین محسوب می‌شود (۴). پژوهش‌های پیشین فعال‌شدن سیستم SOS در پی تیمار با سیپروفلوکساسین را نشان می‌دهند (۴ و ۵). علاوه‌بر RecB، پروتئین RecF نیز در فعال‌شدن این سیستم نقش دارد. ازآنجاکه مطالعه‌های مبتنی بر تجزیه‌وتحلیل جهش و ایجاد جهش در ژن *recF* نتایج متناقضی دربارهٔ اهمیت RecF ارائه می‌دهند (۴)، بررسی بیان این ژن در سلول‌های تیمارشده با سیپروفلوکساسین اطلاعات بیشتری در این زمینه فراهم می‌کند.

RecF به بارگیری RecA در شکاف تک‌رشته کمک می‌کند (۶) و باعث تثبیت فیلامنت RecA-DNA پس‌از تشکیل می‌شود. فیلامنت RecA-RecF ممکن است در مکان چنگال همانندسازی متوقف‌شده تشکیل شود و با شروع جفت‌شدن در شکاف تک‌رشته مانع شروع دوبارهٔ همانندسازی و ترمیم شکست شود (۷).

*recF* در یک اپرون ژنی قرار دارد که در متابولیسم DNA شرکت می‌کند. ژن‌های این اپرون بجز *recF* عبارتند از: *dnaA* کدکنندهٔ پروتئین متصل‌شونده به DNA و لازم برای شروع همانندسازی DNA مبدأ کروموزومی (۸)؛ *dnaN* کدکنندهٔ زیرواحد β و فاکتور پردازشی DNAپلیمراز III (۹)؛ *gyrB* کدکنندهٔ زیرواحد B در DNA gyrase (۱۰). چهار ژن یادشده در یک جهت (از *dnaA* به *gyrB*) باهم رونویسی می‌شوند. مناطق بین‌ژنی *dnaA-dnaN* و *recF-gyrB* به‌ترتیب ۴ و ۳۰ باز دارند و *dnaN* و *recF* در یک باز مشترک هستند. ناحیهٔ پروموتر *recF* حدود ۶۰۰ جفت باز بالادست از کدون آغاز ژن ساختاری *recF* در وسط ژن ساختاری *dnaN* قرار دارد. توالی‌هایی که در بالادست پروموترهای *recF* قرار دارند برای بیان مطلوب ژن *recF* ضروری هستند (۹ و ۱۱).

در سلول‌های در حال رشد در فاز نمایی، *dnaN* و *recF* عمدتاً برای شروع رونویسی از پروموتر اصلی اپرون شروع به رونویسی می‌کنند. پژوهش‌ها نشان می‌دهند فعالیت رونویسی منطقهٔ پروموتری *recF* در *dnaN* طی گذر از فاز نمایی به فاز ثابت رشد افزایش می‌یابد (۱۲). تیمار با سیپروفلوکساسین ممکن است شرایط تنشی مشابه با فاز رکود ایجاد کند. مطالعه‌های پیشین که در زمینهٔ سویه‌های پرسیستر و فاز رکود انجام شده‌اند اهمیت حضور RecF را در این سویه‌ها نشان می‌دهند و مشاهده شده است RecF برای بقای باکتری در رویارویی با آنتی‌بیوتیک ضروری است. پرسیستر

سویه‌هایی هستند که در حضور فلوروکینولون قادر به ادامهٔ بقا بدون ایجاد مقاومت ژنتیکی هستند. هدف پژوهش حاضر بررسی بیان ژن‌های *recF* و *gyrB* در سویهٔ باکتری *اشریشیا کلی* دارای مقاومت کم به سیپروفلوکساسین در فاز نمایی و مقایسهٔ میزان بیان دو ژن به‌منظور تعیین احتمالی الگوی بیان ژن *recF* است.

## مواد و روش‌ها

ویژگی‌های ژنتیکی و فنوتیپی جهش‌یافته و تیپ وحشی باکتری *اشریشیا کلی* در جدول ۱ دیده می‌شوند (۱۳).

جدول ۱- ویژگی‌های سویه‌ها

| نام سویه | ویژگی‌های ژنتیکی/فنوتیپی |
|---|---|
| MG1655 | تیپ وحشی/ حساس به سیپروفلوکساسین |
| SM1 | F⁻ λ⁻ *dinI:km*/جهش‌یافته با مقاومت کم به سیپروفلوکساسین |

به‌منظور طراحی پرایمرها ابتدا توالی ژن *recF* از سامانهٔ NCBI دریافت شد؛ سپس پرایمر *recF* با نرم‌افزار الیگو[1] و به کمک سامانهٔ یادشده طراحی شد. آغازگر *gyrB* در مطالعه‌های پیشین طراحی شده بود (۱۴). ویژگی‌های تمام پرایمرهای استفاده‌شده در پژوهش حاضر در جدول ۲ آمده است.

جدول ۲- آغازگرهای استفاده‌شده

| نوع آغازگر | توالی | اندازهٔ محصول (جفت باز) |
|---|---|---|
| *recF* F | 5´-TAT GGC TGA TAC CTG TAA GC-3´ | ۱۶۹ |
| *recF* R | 5´-AAT GCG TAA GTC CGC TTT GT-3´ | |
| *gyrB* F | 5´-GAAATTATCGTCACCATTCACGC-3´ | ۲۷۸ |
| *gyrB* R | 5´-GTACACCGTGTTCGTAGATCT-3´ | |

ابتدا از جهش‌یافته‌ها روی محیط کشت Luria Bertoni (LB) آگار کشت تازه تهیه شد و سپس از محیط LBمایع حاوی آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین و محیط LBمایع بدون آنتی‌بیوتیک برای کشت باکتری تیپ وحشی استفاده شد؛ به این منظور، یک کلنی تک از سویه‌های تازه‌کشت‌شده برداشته و در محیط LB مایع تلقیح شد و سپس به‌مدت یک شب در گرمخانهٔ ۳۷ درجهٔ سانتی‌گراد نگهداری شد؛ سپس از این کشت مایع تازه برای تلقیح به محیط LB مایع استفاده شد و پس‌از سپری‌شدن مدت زمان لازم، جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۶۵۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد که تقریباً برابر ۰/۴ بود. برای کالیبره‌کردن دستگاه اسپکتروفتومتر باید محلول شاهد یا استاندارد تهیه می‌شد که در اینجا از محلول LB مایع بدون باکتری استفاده شد. پس‌از بررسی رسیدن باکتری به فاز نمایی از طریق اندازه‌گیری جذب نوری نمونهٔ باکتری، نمونه‌ها برای استخراج RNA استفاده شدند و استخراج RNA با استفاده از کیت استخراج RNA (کیاژن، امریکا) انجام شد. تیمار DNase با استفاده از کیت فرمنتاس ( DNaseI RNase-free، فنلاند) روی نمونه‌های RNA به‌منظور حذف DNA انجام شد (۱۳). برای اطمینان‌یافتن از اینکه نمونه‌های تیمارشده با DNase بدون DNA هستند، واکنش PCR با دمای اتصال آغازگر ۵۰ درجهٔ سانتی‌گراد برای هریک از نمونه‌ها انجام شد و باندی مشاهده نشد. پس‌از اطمینان‌یافتن از نبودآلودگی DNA

در نمونه‌های RNA، جذب نوری و غلظت RNA و میزان خلوص آن در هریک از نمونه‌ها با دستگاه اسپکتروفتومتر UV/Visible (بیوکروم انگلستان) اندازه‌گیری شد. برای سنتز cDNA از کیت یکتاتجهیز (RevertAid™ Reverse Transcriptase، آلمان) استفاده شد و تمام مراحل کار طبق راهنمای کیت انجام شد. جذب نوری و غلظت cDNA و میزان خلوص آن در هریک از نمونه‌ها با دستگاه اسپکتروفتومتر UV/Visible سنجیده شد و سپس PCR برای نمونهٔ cDNA در شرایط دمایی بهینه برای ژن‌های *recF* و *gyrB* انجام شد تا با مشاهده و بررسی باند اختصاصی حاصل از تکثیر cDNA روی ژل آگارز، درستی سنتز cDNA تأیید و از مطلوب‌بودن شرایط دمایی برای به‌کاربردن آن در واکنش Real Time PCR اطمینان حاصل شود (شرایط دمایی بهینه در جدول ۳ آورده شده است). دمای اتصال آغازگرهای *recF* و *gyrB* به‌ترتیب ۵۰ و ۵۶ درجهٔ سانتی‌گراد بود؛ سپس واکنش Real Time PCR برای نمونه‌ها انجام شد (شرایط دمایی بهینه برای Real Time PCR ژن‌ها در جدول ۴ آمده است). نتایج حاصل برای بیان ژن‌ها با استفاده از آزمون تی جفت (T student) و به کمک نرم‌افزارهای SPSS نسخهٔ ۱۶ و Excel بررسی شدند.

جدول ۳- شرایط دمایی PCR ژن‌ها

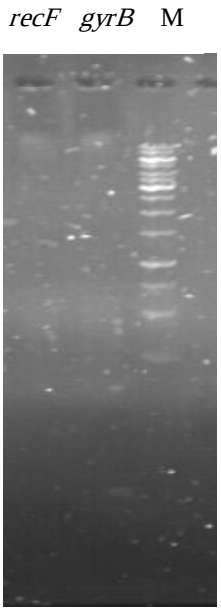
| مرحله | درجه‌حرارت (سانتی‌گراد) | مدت زمان (دقیقه، ثانیه) | چرخه |
|---|---|---|---|
| واسرشت اولیه | ۹۵ | ۳ دقیقه | ۱ چرخه |
| واسرشت | ۹۵ | ۴۵ ثانیه | ۳۵ چرخه |
| اتصال پرایمر | ۵۰ و ۵۶ | ۳۰ ثانیه | ۳۵ چرخه |
| طویل‌شدن | ۷۲ | ۳۰ ثانیه | ۳۵ چرخه |
| طویل‌شدن نهایی | ۷۲ | ۳ دقیقه | ۱ چرخه |

جدول ۴- شرایط دمایی Real Time PCR برای ژن‌ها

| مرحله | درجه‌حرارت (سانتی‌گراد) | مدت زمان (دقیقه، ثانیه) | چرخه |
|---|---|---|---|
| واسرشت اولیه | ۹۵ | ۳ دقیقه | ۱ چرخه |
| واسرشت | ۹۵ | ۱۰ ثانیه | ۴۰ چرخه |
| اتصال پرایمر | ۵۰ و ۵۶ | ۲۰ ثانیه | ۴۰ چرخه |
| طویل‌شدن | ۷۲ | ۳۰ ثانیه | ۴۰ چرخه |
| ذوب | ۷۲ تا ۹۵ | برای هر چرخه ۵ ثانیه | - |

## نتایج

برای تعیین کیفیت و کمیت RNA استخراج‌شده و اطمینان از آلوده‌نبودن نمونه‌ها به DNA از روش PCR استفاده شد. نتیجهٔ ژل الکتروفورز محصول PCR (ژن *recF*) نمونه‌های RNA تیمارشده با DNase برای کسب اطمینان از آلوده‌نبودن به DNA ژنومی در شکل ۱ ارائه شده است. در نمونه‌های RNA تیمارشده با DNase هیچ باندی رویت نشد که نشان‌دهندهٔ آلوده‌نبودن نمونه‌ها به DNA ژنومی است.



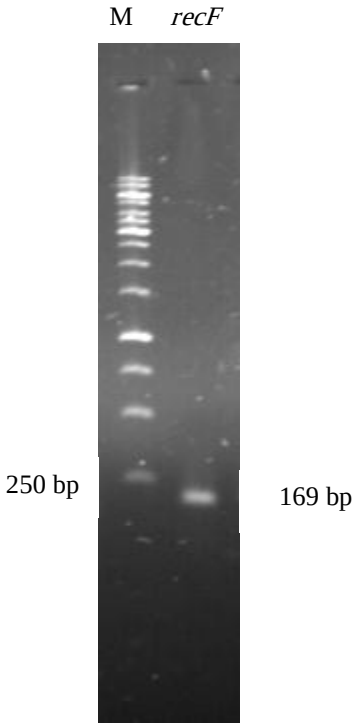

شکل ۱- ژل الکتروفورز بررسی آلوده‌نبودن RNA استخراج‌شده به DNA

تعیین غلظت RNA نمونه‌ها به کمک دستگاه اسپکتروفتومتر روشی دقیق و کمّی برای ارزیابی RNA استخراج‌شده است. جذب نوری و غلظت RNA استخراج‌شده بر حسب میکروگرم بر میکرولیتر و با دستگاه اسپکتوفتونتر UV/Visible در طول موج ۲۶۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. کیفیت RNA استخراج‌شده برای همهٔ نمونه‌ها مطلوب و درصد خلوص زیاد بود. مقادیر $A_{260}/A_{280}$ مناسب و از ۱/۸۵ تا ۲/۲ بود؛ این نسبت برای نمونهٔ SM1 برابر ۲/۱۵ بود. حجم نمونهٔ RNA لازم برای سنتز cDNA باتوجه‌به غلظت RNA در هر نمونه مشخص شد.

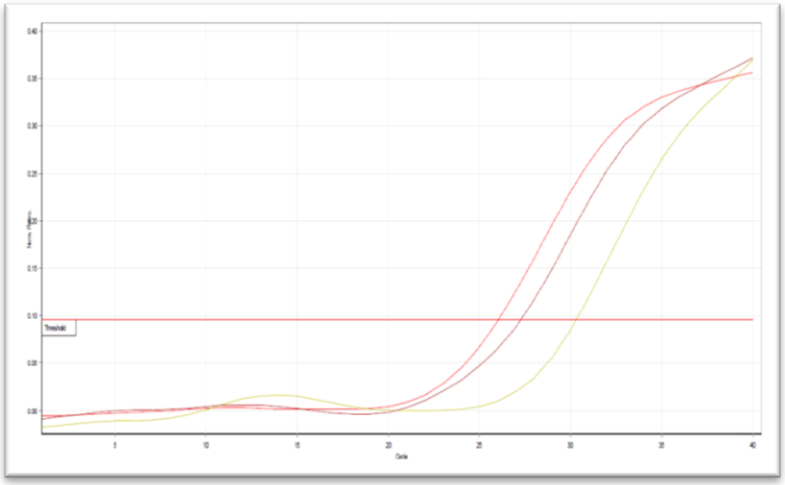
پس‌از سنتز cDNA با استفاده از کیت RevertAid™Reverse Transcriptase، واکنش PCR به‌منظور اطمینان‌یافتن از سنتز cDNA برای ژن‌های موردبررسی تمام نمونه‌ها انجام شد؛ برای نمونه، cDNA نمونهٔ SM1 که با آغازگرهای *recF* تکثیر شده بود در شکل ۲ ارائه شده است. باتوجه‌به نتیجهٔ PCR و شدت باند به‌شکل کیفی از سنتز cDNA اطمینان حاصل شد. نتیجهٔ ژل الکتروفورز محصول PCR نمونه‌های cDNA با آغازگر *recF* روی ژل آگارز ۱ درصد در شکل ۲ مشخص شده است.

ارزیابی کمّی تغییرات بیان ژن‌های *recF* و *gyrB* در سویهٔ تیپ وحشی و نمونهٔ جهش‌یافته به روش Real Time PCR انجام شد. پس‌از تنظیم و بهینه‌کردن شرایط، منحنی تکثیر نمونه‌ها بررسی شد که افزایش سیگنال‌های فلورسنس ساطع‌شده از رنگ سایبرگرین را حین پیشروی چرخه‌های واکنش مشخص می‌کند و با ترسیم خط آستانه، چرخهٔ آستانه برای هریک از نمونه‌ها محاسبه می‌شود. منحنی تکثیر ژن‌های *recF* و *gyrB* به‌ترتیب در شکل‌های ۳ و ۴ نشان داده شده است. نقطهٔ ذوب ژن‌ها نیز اندازه‌گیری شد که برای ژن‌های *recF* و *gyrB* به‌ترتیب ۸۷ و ۹۰ درجهٔ سانتی‌گراد بود.

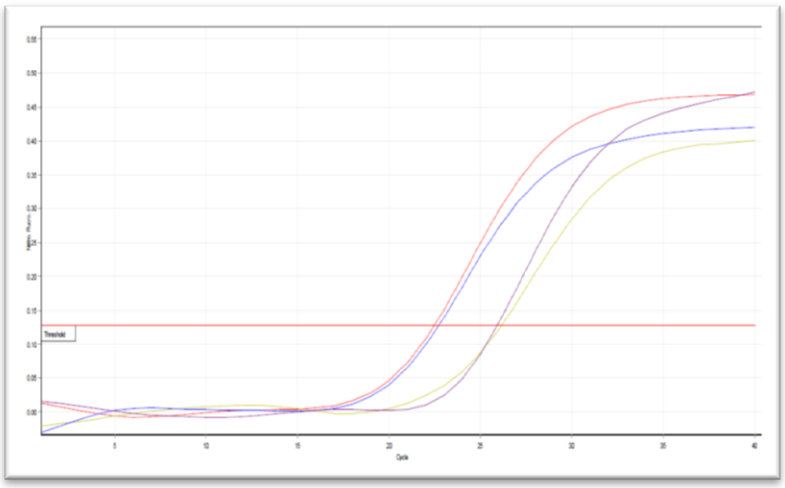
باتوجه‌به نتایج نمودارها و تجزیه‌وتحلیل‌های انجام‌شده روی منحنی استاندارد و Ct واکنش Real Time PCR نمونهٔ تیپ وحشی و جهش‌یافته، سنجش نسبی بیان ژن‌ها به روش فافل (pfaffl) انجام شد. میزان بیان ژن‌ها در سویه‌ها در جدول ۵ ارائه شده است که میانگین سه بار تکرار آزمایش با میزان خطای ۵ درصد است. کارایی هر واکنش بین ۰/۹ تا ۱/۱ بود. مقایسهٔ بیان ژن‌ها در هریک از نمونه‌ها نسبت به تیپ وحشی با نرم‌افزارهای SPSS نسخهٔ ۱۶ و اکسل نشان داد میزان بیان این ژن‌ها در نمونهٔ جهش‌یافته نسبت به سویهٔ وحشی تفاوت معناداری دارد ($P<0.05$). بیان بیشتر از ۲ بیش‌بیان در نظر گرفته شد.




شکل ۲- تجزیه‌وتحلیل cDNA سنتزشده با نشانگر ۱ کیلوباز



شکل ۳- منحنی تکثیر ژن *recF*



شکل ۴- منحنی تکثیر ژن *gyrB*

جدول ۵- بیان نسبی ژن‌های *recF* و *gyrB*

| سویه | بیان نسبی *recF* | مقدار P | بیان نسبی *gyrB* | مقدار P |
|---|---|---|---|---|
| تیپ وحشی | ۱ | | ۱ | |
| SM1 | ۲/۳ | ۰/۰۰۷ | ۲/۵ | ۰/۰۱ |

## بحث و نتیجه‌گیری

همان‌طورکه گفته شد حضور RecF برای بقای باکتری در رویارویی با آنتی‌بیوتیک در سویه‌های پرسیستر ضروری است (۷). هنگام تیمار با سیپروفلوکساسین، RecF به بارگیری RecA در شکاف تک‌رشته کمک می‌کند و باعث تثبیت فیلامنت RecA-DNA می‌شود (۶ و ۷). ژن *recF* در یک اپرون قرار دارد که شامل چهار ژن *dnaA*، *dnaN*

*gyrB* و *recF* است که در یک جهت رونویسی می‌شوند (۹ و ۱۱). بیان ژن *recF* باعث تولید پروتئین RecF و ژن *gyrB* منجر به تولید زیرواحد B پروتئین DNAجیراز می‌شود؛ همچنین *recF* یک منطقهٔ پروموتری مربوط به خودش دارد که در وسط ژن *dnaN* قرار دارد و *recF* و *gyrB* در فاز نمایی از پروموتر *dnaA* رونویسی می‌شوند (۱۱).

در پژوهش حاضر، بررسی بیان ژن *recF* در سویهٔ جهش‌یافتهٔ SM1 در مقایسه با سویهٔ وحشی MG1655 به روش Real Time PCR از طریق سنجش بیان نسبی انجام شد. نمونهٔ جهش‌یافته دارای مقاومت کم به آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین بود (۱۴).

یافته‌های پژوهش اختلاف معنادار بیان ژن *recF* را در نمونهٔ دارای مقاومت کم به آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین و تیپ وحشی نشان دادند و مشاهده شد این ژن در سویهٔ دارای مقاومت کم به سیپروفلوکساسین افزایش بیان دو برابری نسبت به تیپ وحشی دارد. همچنین یافته‌های پژوهش نشان دادند ژن *gyrB* دارای افزایش بیان تا حد زیادی به‌اندازهٔ *recF* است ($P<0.05$) و نتیجه گرفته می‌شود احتمالاً *recF* در رشد نمایی در حضور سیپروفلوکساسین از طریق پروموتر اصلی اپرون بیان می‌شود و از پروموتر اختصاصی خود استفاده نمی‌کند. به نظر می‌رسد در تیمار با آنتی‌بیوتیک شرایط مشابه با فاز رکود ایجاد نمی‌شود و باکتری به‌شکل پرسیستر تبدیل نمی‌شود؛ شاید این میزان آنتی‌بیوتیک باکتری را به این مرحله نرساند و شاید مقدار آنتی‌بیوتیک بیشتر شرایط متفاوتی ایجاد کند؛ هرچند مقاومت به سیپروفلوکساسین در مقدار کم دیده شد و در نتیجه امکان استفاده از مقادیر بیشتر آنتی‌بیوتیک وجود نداشت.

## سپاسگزاری

از دانشگاه شهرکرد برای حمایت مالی از پژوهش حاضر تشکر و قدردانی می‌شود.

## References

(1) Sharma PC., Jain A., Jain S. Fluoroquinolone antibacterials: a review on chemistry, microbiology and therapeutic prospects. *Acta Poloniae Pharmaceutica* 2009; 66(6): 587-604.

(2) Davis R., Markham A., Balfour JA. Ciprofloxacin, an updated review of its pharmacology, therapeutic efficacy and tolerability. *Drugs* 1996; 6: 1019-1074.

(3) Ruiz J. Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2003; 51: 1109-1117.

(4) Cirz RT., Chin JK., Andes DR., Crecy-Legard V., Craig WA., Romesberg FE. Inhibition of mutation and combating the evolution of antibiotic resistance. *PLOS Biology* 2005; 3: 1024-1033.

(5) Pourahmad Jaktaji R., Pasand S. Overexpression of SOS genes in ciprofloxacin resistant *Escherichia coli* mutants. *Gene* 2016; 576: 115-118.

(6) Michel-Marks E., Courcelle CT., Korolev S., Courcelle J. ATP binding, ATP hydrolysis, and protein dimerization are required for RecF to catalyze an early step in the processing and recovery of replication forks disrupted by DNA damage. *Journal of Molecular Biology* 2010; 401(4): 579-589.

(7) Theodore A., Lewis K., Vulić M. Tolerance of *Escherichia coli* to fluoroquinolone antibiotics depends on specific components of the SOS response pathway. *Genetics* 2013; 195(4): 1265-1276.

(8) Leonard AC., Grimwade JE. Regulating DnaA complex assembly: it is time to fill the gaps. *Current Opinion in Microbiology* 2010; 13(6): 766-772.

(9) Perez-Roger I., Garcia-Sogo M., Navarro-Avino J., Lopez-Acedo C., Macian F., Armengod M. Positive and negative regulatory elements in the *dnaA-dnaN-recF* operon of *Escherichia coli*. *Biochimie* 1991; 73(2-3): 329-334.

(10) Wang LT., Lee FL., Tai CJ., Kasai H. Comparison of *gyrB* gene sequences, *16S rRNA* gene sequences and DNA–DNA hybridization in the Bacillus subtilis group. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2007; 57(8): 1846-1850.

(11) Armengod ME., Lambíes E. Overlapping arrangement of the *recF* and *dnaN* operons of *Escherlchia coli*; positive and negative control sequences. *Gene* 1986; 43(3): 183-196.

(12) Villarroya M., Pérez-Roger I., Macián F., Armengod ME. Stationary phase induction of *dnaN* and *recF*, two genes of *Escherichia coli* involved in DNA replication and repair. *The EMBO journal* 1998; 17(6): 1829-1837.

(13) Mohammadi S., Pourahmad R., Mahzoonieh MR. *recA* gene expression in ciprofloxacin resistant *Escherichia coli dinI*⁻ mutant. *Biological Journal of Microorganism* 2018; in press (in Persian).

(14) Tani K., Kobayashi T., Sakotani A., Kenzaka T., Nasu M. Expression of the *gyrB* gene as an indicator of growth activity of *Escherichia coli*. *Journal of Environmental Biotechology* 2012; 12: 33-38.

[1]- OLIGO