

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 جهش یافته اش‌ریشیا کلی با مقاومت کم به سیروفلوکساسین

مرضیه سادات موسوی: دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه ژنتیک، دانشکده علوم، دانشگاه شهرکرد، ایران، marzieh.sadat7112@gmail.com
راضیه پوراحمد*: دانشیار ژنتیک، گروه ژنتیک، دانشکده علوم، دانشگاه شهرکرد، ایران، razieh_jaktaji@yahoo.com
محمد رضا محزونیه: استاد میکروبیولوژی دامپزشکی، گروه پاتوبیولوژی، دانشکده 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 به ترتیب در فرایندهای یادشده شرکت می‌کنند. *GyrB* زیرواحد آنزیم DNA جیراز است؛ آنزیمی که ابرپیش منفی در DNA ژنومی را حفظ می‌کند. *RecF* به سوار شدن *RecA* در شکاف تک‌رشته کمک می‌کند و بعداً *RecA* تک‌رشته را ترمیم می‌کند. ژن‌های کدکننده این پروتئین‌ها در یک اپرون قرار دارند. علاوه بر پروموتور عمومی که در فاز نمایی استفاده می‌شود، *RecF* دارای پروموتور خودی است که در فاز رکود فعال می‌شود. هدف مطالعه حاضر بررسی بیان این ژن‌ها و پیشگویی الگوی بیان *RecF* در حضور سیروفلوکساسین است.

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

نتایج: نتایج نشان دادند هر دو ژن یادشده به‌طور مشابه در فاز نمایی سلول جهش یافته تیمار شده با مقدار کم سیروفلوکساسین بیش بیان می‌شوند.

بحث و نتیجه گیری: طبق نتایج، سیروفلوکساسین بیش بیان ژن‌های یادشده را القا می‌کند؛ هر چند سطح مشابه بیان ممکن است رونویسی *RecF* توسط پروموتور خودی را پیشنهاد نکند و در نتیجه *RecF* برای ترمیم آسیب ناشی از سیروفلوکساسین لازم است؛ هر چند حیات سلول به‌طور کامل وابسته به این پروتئین نیست.

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

* نویسنده مسئول مکاتبات

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 DNA جیراز در باکتری‌های گرم منفی نظیر *اشریشیا کلی* می‌شوند (۳)؛ برای این منظور به آنزیم جیراز متصل به DNA که کمپلکس قابل شکست نامیده می‌شود (به علت وجود شکست در دو رشته) وصل می‌شوند و کمپلکس سه‌تایی ایجاد می‌کنند که مانع ادامه رونویسی و همانندسازی DNA باکتری می‌شود. جدا شدن آنزیم از کمپلکس باعث آزاد شدن شکست دورشته‌ای می‌شود که چنانچه با فرایند نوترکیبی وابسته به RecB ترمیم نشود سبب مرگ سلول می‌شود؛ از این رو، RecB پروتئینی حیاتی برای سلول تیمار شده با سیپروفلوکساسین محسوب می‌شود (۴). پژوهش‌های پیشین فعال‌شدن سیستم SOS در پی تیمار با سیپروفلوکساسین را نشان می‌دهند (۴ و ۵). علاوه بر RecB، پروتئین RecF نیز در فعال‌شدن این سیستم نقش دارد. از آنجا که مطالعه‌های مبتنی بر تجزیه و تحلیل جهش و ایجاد جهش در ژن *recF* نتایج متناقضی درباره اهمیت RecF ارائه می‌دهند (۴)، بررسی بیان این ژن در سلول‌های تیمار شده 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 پس از تشکیل می‌شود. فیلامنت RecA-RecF ممکن

است در مکان چنگال همانندسازی متوقف شده تشکیل شود و با شروع جفت‌شدن در شکاف تک‌رشته مانع شروع دوباره 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* کدکننده پروتئین متصل‌شونده به DNA و لازم برای شروع همانندسازی DNA مبدأ کروموزومی (۸)؛ *dnaN* کدکننده زیرواحد β و فاکتور پردازشی DNA پلیمرراز III (۹)؛ *gyrB* کدکننده 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* به ترتیب ۴ و ۳۰ باز دارند و *dnaN* و *recF* در یک باز مشترک هستند. ناحیه پروموتور *recF* حدود ۶۰۰ جفت باز بالادست از کدون آغاز ژن ساختاری *recF* در وسط ژن ساختاری *dnaN* قرار دارد. توالی‌هایی که در بالادست پروموتورهای *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 پروموتور اصلی اپرون شروع به رونویسی می‌کنند. پژوهش‌ها نشان می‌دهند فعالیت رونویسی منطقه پروموتوری *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 زمینه 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

جدول ۱- ویژگی‌های سویه‌ها

نام سویه	ویژگی‌های ژنتیکی/فنوتیپی
MG1655	تیپ وحشی / حساس به سیروفلوکساسین
SM1	<i>F⁺ K⁺ dinI:km</i> / جهش‌یافته با مقاومت کم به سیروفلوکساسین

به‌منظور طراحی پرایمرها ابتدا توالی ژن *recF* از سامانه NCBI دریافت شد؛ سپس پرایمر *recF* با نرم‌افزار الیگو^۱ و به کمک سامانه 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	اندازه محصول (جفت باز)
<i>recF</i> F	5'-TAT GGC TGA TAC CTG TAA GC-3'	۱۶۹
<i>recF</i> R	5'-AAT GCG TAA GTC CGC TTT GT-3'	
<i>gyrB</i> F	5'-GAAATTATCGTCACCATTACGC-3'	۲۷۸
<i>gyrB</i> R	5'-GTACACCGTGTTCGTAGATCT-3'	

شاهد یا استاندارد تهیه می‌شد که در اینجا از محلول LB مایع بدون باکتری استفاده شد. پس از بررسی رسیدن باکتری به فاز نمایی از طریق اندازه‌گیری جذب نوری نمونه 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 اطمینان یافتن از اینکه نمونه‌های تیمار شده با DNase بدون DNA هستند، واکنش PCR با دمای اتصال آغازگر ۵۰ درجه سانتی‌گراد برای هر یک از نمونه‌ها انجام شد و بانندی مشاهده نشد. پس از اطمینان یافتن از نبود آلودگی DNA

سویه‌هایی هستند که در حضور فلوروکینولون قادر به ادامه بقا بدون ایجاد مقاومت ژنتیکی هستند. هدف پژوهش حاضر بررسی بیان ژن‌های *recF* و *gyrB* در سویه باکتری /شریشیاکلی دارای مقاومت کم به سیروفلوکساسین در فاز نمایی و مقایسه میزان بیان دو ژن به‌منظور تعیین احتمالی الگوی بیان ژن *recF* است.

مواد و روش‌ها

ویژگی‌های ژنتیکی و فنوتیپی جهش‌یافته و تیپ وحشی باکتری /شریشیاکلی در جدول ۱ دیده می‌شوند (۱۳).

ابتدا از جهش‌یافته‌ها روی محیط کشت Luria Bertoni (LB) آگار کشت تازه تهیه شد و سپس از محیط LB مایع حاوی آنتی‌بیوتیک سیروفلوکساسین و محیط LB مایع بدون آنتی‌بیوتیک برای کشت باکتری تیپ وحشی استفاده شد؛ به این منظور، یک کلنی تک از سویه‌های تازه کشت شده برداشته و در محیط LB مایع تلقیح شد و سپس به مدت یک شب در گرمخانه ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد؛ سپس از این کشت مایع تازه برای تلقیح به محیط LB مایع استفاده شد و پس از سپری شدن مدت زمان لازم، جذب نوری نمونه‌ها در طول موج ۶۵۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد که تقریباً برابر ۰/۴ بود. برای کالیبره کردن دستگاه اسپکتروفتومتر باید محلول

جدول ۴- شرایط دمایی Real Time PCR برای ژن‌ها

مرحله	درجه حرارت (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
طویل شدن	۷۲	۳۰ ثانیه	۴۰ چرخه
ذوب	۷۲ تا ۹۵	برای هر چرخه ۵ ثانیه	-

نتایج

برای تعیین کیفیت و کمیت RNA استخراج شده و اطمینان از آلوده نبودن نمونه‌ها به DNA از روش PCR استفاده شد. نتیجه ژل الکتروفورز محصول PCR (ژن *recF*) نمونه‌های RNA تیمار شده با DNase برای کسب اطمینان از آلوده نبودن به DNA ژنومی در شکل ۱ ارائه شده است. در نمونه‌های RNA تیمار شده با DNase هیچ بانندی رویت نشد که نشان‌دهنده آلوده نبودن نمونه‌ها به DNA ژنومی است.

recF gyrB M



شکل ۱- ژل الکتروفورز بررسی آلوده نبودن RNA استخراج شده

به DNA

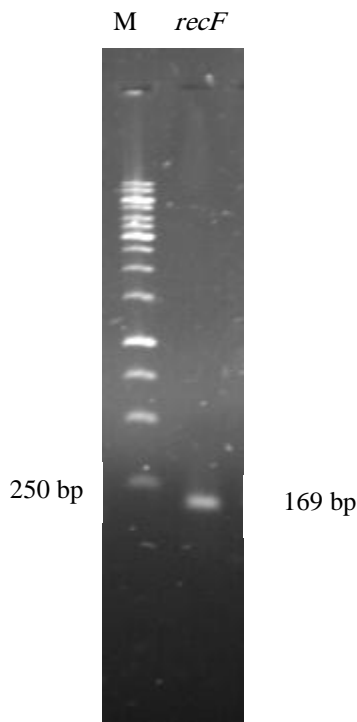
در نمونه‌های RNA، جذب نوری و غلظت RNA میزان خلوص آن در هریک از نمونه‌ها با دستگاه اسپکتروفتومتر UV/Visible (بیوکروم انگلستان) اندازه‌گیری شد. برای سنتز cDNA از کیت یکتاتجهیز (RevertAid™ Reverse Transcriptase، آلمان) استفاده شد و تمام مراحل کار طبق راهنمای کیت انجام شد. جذب نوری و غلظت cDNA و میزان خلوص آن در هریک از نمونه‌ها با دستگاه اسپکتروفتومتر UV/Visible سنجیده شد و سپس PCR برای نمونه cDNA در شرایط دمایی بهینه برای ژن‌های *gyrB* و *recF* انجام شد تا با مشاهده و بررسی باندهای اختصاصی حاصل از تکثیر cDNA روی ژل آگاروز، درستی سنتز cDNA تأیید و از مطلوب بودن 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 *gyrB* و *recF* به ترتیب ۵۰ و ۵۶ درجه 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 نسخه ۱۶ و Excel بررسی شدند.

جدول ۳- شرایط دمایی PCR ژن‌ها

مرحله	درجه حرارت (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
طویل شدن	۷۲	۳۰ ثانیه	۳۵ چرخه
طویل شدن نهایی	۷۲	۳ دقیقه	۱ چرخه

به ترتیب در شکل‌های ۳ و ۴ نشان داده شده است. نقطه ذوب ژن‌ها نیز اندازه‌گیری شد که برای ژن‌های *recF* و *gyrB* به ترتیب ۸۷ و ۹۰ درجه سانتی‌گراد بود.

باتوجه به نتایج نمودارها و تجزیه و تحلیل‌های انجام‌شده روی منحنی استاندارد و Ct واکنش Real Time PCR نمونه 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. مقایسه بیان ژن‌ها در هر یک از نمونه‌ها نسبت به تیپ وحشی با نرم‌افزارهای SPSS نسخه ۱۶ و اکسل نشان داد میزان بیان این ژن‌ها در نمونه جهش‌یافته نسبت به سویه وحشی تفاوت معناداری دارد ($P < 0.05$). بیان بیشتر از ۲ بیش‌بیان در نظر گرفته شد.

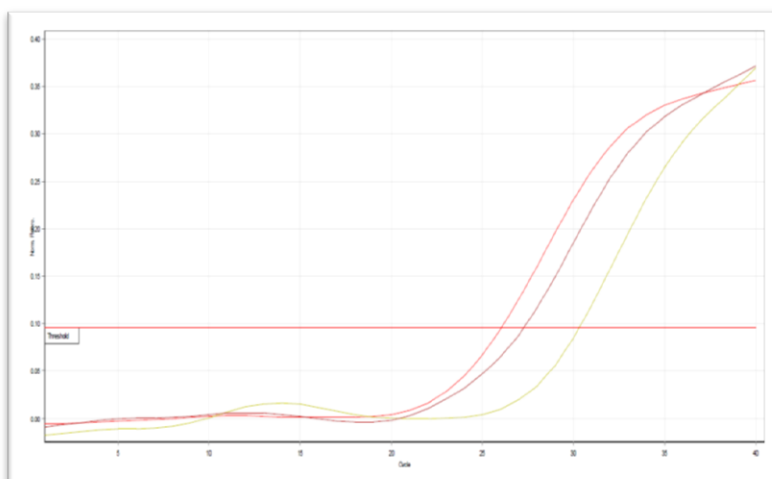
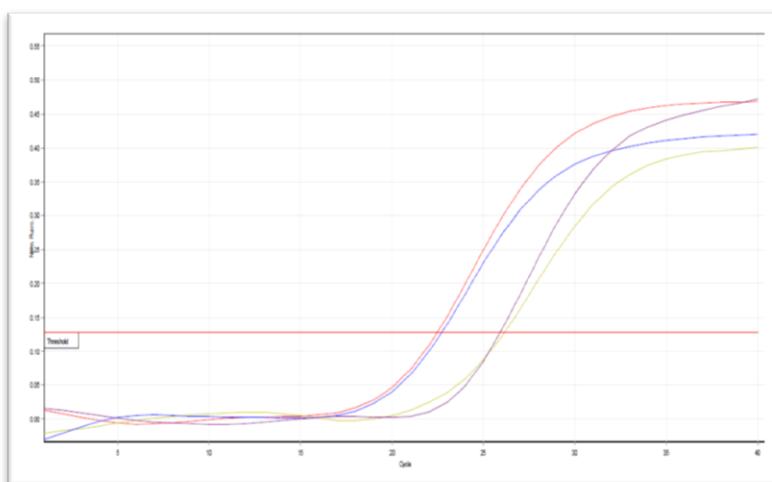


شکل ۲- تجزیه و تحلیل cDNA سنتز شده با نشانگر ۱ کیلوباز

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

پس از سنتز cDNA با استفاده از کیت RevertAid™ Reverse Transcriptase، واکنش PCR به منظور اطمینان یافتن از سنتز cDNA برای ژن‌های مورد بررسی تمام نمونه‌ها انجام شد؛ برای نمونه، cDNA نمونه SM1 که با آغازگرهای *recF* تکثیر شده بود در شکل ۲ ارائه شده است. باتوجه به نتیجه PCR و شدت باند به شکل کیفی از سنتز cDNA اطمینان حاصل شد. نتیجه ژل الکتروفورز محصول PCR نمونه‌های cDNA با آغازگر *recF* روی ژل آگارز ۱ درصد در شکل ۲ مشخص شده است.

ارزیابی کمی تغییرات بیان ژن‌های *recF* و *gyrB* در سویه تیپ وحشی و نمونه جهش‌یافته به روش Real Time PCR انجام شد. پس از تنظیم و بهینه کردن شرایط، منحنی تکثیر نمونه‌ها بررسی شد که افزایش سیگنال‌های فلورسنس ساطع شده از رنگ‌سایبرگرین را حین پیشروی چرخه‌های واکنش مشخص می‌کند و با ترسیم خط آستانه، چرخه آستانه برای هر یک از نمونه‌ها محاسبه می‌شود. منحنی تکثیر ژن‌های *recF* و *gyrB*

شکل ۳- منحنی تکثیر ژن *recF*شکل ۴- منحنی تکثیر ژن *gyrB*جدول ۵- بیان نسبی ژن‌های *recF* و *gyrB*

مقدار P	بیان نسبی <i>gyrB</i>	مقدار P	بیان نسبی <i>recF</i>	سویه
	۱		۱	تیپ وحشی
۰/۰۱	۲/۵	۰/۰۰۷	۲/۳	SM1

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*

بحث و نتیجه‌گیری

همان‌طور که گفته شد حضور *RecF* برای بقای باکتری در رویارویی با آنتی‌بیوتیک در سویه‌های پرسیستر ضروری است (۷). هنگام تیمار با

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.

recF و *gyrB* 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 DNA-جیراز می‌شود؛ همچنین *recF* یک منطقه 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 سویه جهش یافته SM1 در مقایسه با سویه وحشی MG1655 به روش Real Time PCR از طریق سنجش بیان نسبی انجام شد. نمونه جهش یافته دارای مقاومت کم به آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین بود (۱۴).

یافته‌های پژوهش اختلاف معنادار بیان ژن *recF* را در نمونه دارای مقاومت کم به آنتی‌بیوتیک سیپروفلوکساسین و تیپ وحشی نشان دادند و مشاهده شد این ژن در سویه 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 به اندازه *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 به شکل 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.

- (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., Lambies E. Overlapping arrangement of the *recF* and *dnaN* operons of *Escherichia 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 Biotechnology* 2012; 12: 33-38.

¹- OLIGO