

ABSTRACT

Salmonella typhi S8 is resistant to ampicillin (Ac), chloramphenicol (Cm), co-trimoxazole (Ctm), streptomycin (Sm), and tetracycline (Tc). The Ac, Cm, Ctm, and Sm resistance traits have been shown to be mediated by a multiple antibiotic resistance transposon located on a large conjugative plasmid. Transposition of the transposon encoding Ac^R (ampicillin resistance), Cm^R, Ctm^R, and Sm^R, designated TnX8, was done by Wong (1999) to a recipient replicon, plasmid pUB307. The Ac^R, Cm^R, Ctm^R, and Sm^R genes were subcloned into plasmid pKan by digesting the recombinant plasmid, designated pCL8 (pUB307::TnX8), with *SalI*. This subcloning strategy generated different recombinant pKans that harbour different antibiotic resistance genes. Plasmid pCLS55 is a recombinant pKan that harbours a *SalI* insert bearing Sm^R genes from the multiple antibiotic resistance transposon of *S. typhi* S8.

The main objective of this study was to subclone and characterize, by DNA sequencing, the Sm^R genes derived from the transposon of *S. typhi* S8, in pCLS55. Successive subclonings into pUC19 and M13mp18 vectors, and construction of deletions localized the Sm^R genes on a 2.5 kb *EcoRI* DNA fragment. Southern hybridization, performed before DNA sequencing, confirmed that the 2.5 kb *EcoRI* Sm^R inserts carried by M13pSMR13 and M13pSMS16 originated from the plasmid in *S. typhi* S8.

A total of 2,128 nucleotides was determined based on complete DNA sequencing of the 2.5 kb *EcoRI* Sm^R insert in recombinant M13mp18. The nucleotide sequences were analyzed and the gene structure (containing *str* genes, *strA* and *strB*) within the 2.5 kb *EcoRI* Sm^R insert from pCLS55 was determined. These sequences were identical to the *strA* and *strB* genes encoding Sm resistance in plasmid RSF1010 (Scholz *et al.*, 1989) and in Tn5393 of *Erwinia amylovora* (Chiou and Jones, 1993).

The nucleotide sequences obtained in this study indicated that there are three open reading frames (ORF) in the 2.5 kb *EcoRI* Sm^R fragment. The first ORF of 267 amino acids was designated ORF A'. The deduced amino acid sequence corresponded to a molecular mass of 29,595 Daltons and has high similarity with the amino acid sequence of Sm phosphotransferase protein A, which is also encoded by RSF1010

and Tn5393. This ORF translation starts at UUG (TTG in the DNA sequence) and this suggests that this gene did not originally come from members of the family *Enterobacteriaceae*.

The second ORF, designated ORF B', encodes a polypeptide of 278 amino acids; which corresponded to a molecular mass of 30,824 Daltons and has high similarity with the amino acid sequence of Sm phosphotransferase protein B.

The Sm^R genes were also observed to contain part of the transposase gene belonging to IS26 and its variants. This was observed in the third ORF, ORF C', in the nucleotide sequences obtained. Partial DNA sequencing of the 5.5 kb *SalI* insert in pCLS55 showed that the two ends of this insert each contained part of the transposase gene of IS26 and its variants.

The Sm^R genes in pCLS55 appeared to be borne on a composite element, flanked by IS26 at its ends. The presence of the composite IS26 element within TnX8 supports the hypothesis that multiple antibiotic resistance transposons evolved by insertion of antibiotic resistance determinants, which are themselves transposable.

ABSTRAK

Salmonella typhi S8 adalah rintang terhadap ampisilin (Ac), kloramfenicol (Cm), ko-trimoxazole (Ctm), streptomisin (Sm), dan tetrasiklin (Tc). Ciri-ciri kerintangan terhadap Ac, Cm, Ctm, dan Sm adalah diperantarakan oleh suatu transposon pelbagai kerintangan antibiotik yang berlokasi pada suatu plasmid konjugatif yang besar. Transposisi transposon *TnX8*, transposon yang mengkodkan Ac^R (kerintangan terhadap ampisilin), Cm^R , Ctm^R , dan Sm^R , kepada replikon penerima iaitu plasmid pUB307 telah dilakukan oleh Wong (1999).

Hasil transposisi tersebut iaitu plasmid rekombinan pUB307, yang didesignasi sebagai pCL8 (pUB307::TnX8), dicerna dengan enzim pencerna *SaI* untuk mensubklonkan gen-gen Ac^R , Cm^R , Ctm^R , dan Sm^R ke dalam plasmid pKan. Strategi penubklonan ini menjana beberapa pKan rekombinan yang mengandungi gen-gen kerintangan antibiotik yang berlainan. Plasmid pCLS55 adalah sejenis pKan rekombinan yang mengandungi gen-gen Sm^R dalam satu fragmen *SaI* bersaiz 5.5 kb daripada transposon pelbagai kerintangan *S. typhi* S8.

Objektif utama kajian ini adalah untuk mensubklon dan mencirikan, melalui penjujukan DNA, gen-gen Sm^R dalam pCLS55 yang diterbitkan dari transposon *S. typhi* S8. Penubklonan berturutan kedalam vektor pUC19 dan sejurusnya kedalam vektor M13mp18, serta penjanaaan delesi berjaya melokasikan gen-gen Sm^R pada satu fragmen *EcoRI* bersaiz 2.5 kb. Sebelum penjujukan DNA, hibridisasi Southern dilakukan dan ia menunjukkan bahawa asalan fragmen Sm^R *EcoRI* bersaiz 2.5 kb ini adalah sememangnya dari plasmid *S. typhi* S8.

Nukeotida-nukleotida berjumlah 2,128 ditentukan berdasarkan penjujukan DNA seluruhan fragmen *EcoRI* bersaiz 2.5 kb yang terkandung dalam M13mp18 rekombinan. Jujukan nukleotida yang diperolehi dianalisis dan struktur gen (yang mengandungi gen-gen *str*, iaitu *strA* dan *strB*) dalam fragmen *EcoRI* bersaiz 2.5 kb daripada pCLS55 berjaya ditentukaan. Jujukan-jujukan ini didapati seiras dengan gen-gen *strA* dan *strB* yang mengkodkan kerintangan terhadap Sm dalam plasmid RSF1010 (Scholz *et al.*, 1989) dan dalam Tn5393 yang termaktub dalam *Erwinia amylovora* (Chiou and Jones, 1993).

Jujukan nukleotida yang diperolehi dalam kajian ini menunjukkan bahawa ada tiga bingkai bacaan terbuka (ORF, "open reading frame") dalam fragmen Sm^R *EcoRI* bersaiz 2.5 kb. Bingkai bacaan pertama yang berdesignasi ORF A' mengandungi 267 asid amino dan sejajar dengan berat molekul 29,595 Dalton. Ia mempunyai kesamaan tinggi dengan jujukan asid amino protin A fosfotransferase Sm yang dikodkan oleh RSF1010 dan Tn5393. Translasi ORF ini bermula dengan UUG (TTG dalam jujukan DNA) dan mencadangkan bahawa gen *strA* ini tidak berasal daripada ahli famili *Enterobacteriaceae*.

Bingkai bacaan kedua berdesignasi ORF B' mengkodkan polipeptida sebesar 278 asid amino dan sejajar dengan berat molekul 30,824 Dalton. Analisa jujukan asid amino ini sejajar dengan protin B fosfotransferase Sm yang dikodkan oleh gen *strB* RSF1010 dan Tn5393. Gen-gen Sm^R ini didapati juga mengandungi sebahagian gen enzim transposisi IS26 dan variasinya. Ini diperhatikan dalam bingkai bacaan ketiga, yakni ORF C', dalam jujukan nukleotida yang diperolehi dalam kajian ini. Penjujukan DNA separa juga dilakukan terhadap fragmen *SaII* bersaiz 5.5 kb dari pCLS55. Analisa jujukan nukleotid separa yang diperolehi ini juga menunjukkan kehadiran gen enzim transposisi IS26 dan variasinya.

Gen-gen Sm^R dalam pCLS55 didapati termaktub dalam elemen komposit kerana ia diapiti oleh IS26 pada kedua-dua hujungnya. Kehadiran elemen komposit IS26 dalam Tn χ 8 mengukuhkan lagi hipotesis bahawa transposon pelbagai kerintangan antibiotik berevolusi melalui insersi penentu-penentu antibiotik, yang mempunyai keupayaan untuk bertransposisi secara sendiri.