

网络出版时间: 2016-6-22 14:44:58 网络出版地址: http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20160622.1444.016.html

肠出血性大肠杆菌 z4832 基因缺失突变株的构建

谭林林^{1,2}, 王建新², 李涛², 王慧^{1,2}

摘要 目的 利用 Red 重组系统的同源重组功能, 敲除肠出血性大肠杆菌 O157:H7 (EHEC O157:H7) 的乙酰转移酶基因 z4832, 构建 z4832 基因缺失突变株。方法 EHEC O157:H7 的基因组作为模板, PCR 扩增目的基因两侧的同源臂序列; 将上下游同源臂连接于 pUC19-kana 质粒上卡那霉素(kana)抗性基因的两端; PCR 扩增获得中间嵌合卡那霉素抗性基因的同源臂线性片段, 利用质粒 pKD46 介导的重组技术敲除 z4832 基因, 利用 pCP20 质粒介导的重组技术去除抗性标记。PCR 扩增及 DNA 测序验证目的基因缺失后, 测定突变株及野生株的生长曲线, 检测在抗菌药物氧氟沙星中的存活率。结果 成功构建 EHEC O157:H7 z4832 基因缺失突变株。z4832 缺失突变株生长速度与野生株差异无统计学意义, 但在含氧氟沙星的 LB 培养基中突变株存活率升高 ($P < 0.05$), 在含氧氟沙星的 M9 培养基中存活率下降 ($P < 0.05$)。结论 构建 z4832 缺失突变株, 研究 z4832 与肠出血性大肠杆菌耐药性之间的关系, 为进一步研究乙酰转移酶在 EHEC O157:H7 中的作用机制奠定了基础。

关键词 肠出血性大肠杆菌 O157:H7; Red 重组系统; 乙酰转移酶; 抗生素

中图分类号 Q 939.93

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)08-1111-05

肠出血性大肠杆菌(EHEC)是主要的食源性致病菌之一, 通过粪便或屠宰过程污染饮水和肉类及其他食品, 并且可以在水果蔬菜中长期存活^[1]。由其引发的食物中毒在世界各地均有过暴发流行^[2]。人感染该病原菌后可引发溶血性尿毒综合征(hemolytic uremic syndrome, HUS)及血栓性血小板减少紫癜(thrombotic thrombocytopenic purpura, TTP)等严重并发症^[3]。生物信息分析结果显示 EHEC O157:H7 基因组中 z4832 基因所编码蛋白为乙酰

转移酶。蛋白质乙酰化修饰因为被发现参与转录、代谢等多个重要领域而受到广泛关注和研究^[4-6]。经预测 z4832 基因属于 GNAT 家族。GNAT 家族在生物界广泛存在, 能够把乙酰辅酶 A 的乙酰基转移至乙酰基受体上, 通过改变小分子或者蛋白质的结构和功能从而发挥生理功能^[7-10]。该研究利用 Red 同源重组系统, 敲除 EHEC O157:H7 的乙酰转移酶基因 z4832, 构建 z4832 基因缺失突变株; 结果表明 z4832 基因缺失突变株在含有氧氟沙星的培养基中存活率发生改变。这为将来研究 EHEC 的致病机制提供了依据和材料。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒 EHEC O157:H7 EDL933 菌株、pCP20 质粒、pKD46 质粒、插入卡那霉素(kana)抗性基因的质粒 pUC19-kana 由军事医学科学院保存; 大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞、pEASY-T1 simple 载体和大肠杆菌 BL21(DE3) 表达感受态细胞购自北京 TransGen 生物技术有限公司。

1.1.2 引物设计 PCR 引物由中美泰和生物技术有限公司合成(表 1), 其中 U1-Hind III、U2-Sal I 用于扩增 z4832 基因上游 500 bp 同源臂(z4832-up); D1-BamH I、D2-EcoR I 用于扩增 z4832 基因下游 500 bp 同源臂(z4832-down); kana-Sal I、kana-BamH I 用于扩增 kana 基因(带有 FRT 位点)。

表 1 引物序列

引物名称	引物序列(5'-3')
U1-Hind III	AAGCTTGAGAAAGCGCATCTGAAAGGC
U2-Sal I	GTCGACAATTATTACATTCCTGAAG
D1-BamH I	GGATCCCGCTTCTCCAGCCGCCCTGC
D2-EcoR I	GAATTCACCTTGTAAATTATGCTGTTA
kana-Sal I	GTCGACAGCGATTGTAGGCTGGAG
kana-BamH I	GGATCCATGGGAATTAGCCATGGTCCA

1.1.3 主要试剂 基因组提取试剂盒购自美国 Promega 公司; TransStart Taq DNA 聚合酶、PCR 产物纯化试剂盒购自北京 TransGen 生物技术有限公司; 质粒小提试剂盒、琼脂糖凝胶回收试剂盒购自北京

2016-05-04 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81401643)

作者单位: ¹ 安徽医科大学军事医学科学院微生物流行病学研究所, 合肥 230032² 军事医学科学院微生物流行病学研究所病原微生物生物安全国家重点实验室, 北京 100071

作者简介: 谭林林, 女, 硕士研究生;

王慧, 女, 博士生导师, 责任作者, E-mail: geno0109@vip.sina.com

康为世纪生物科技有限公司; 限制性核酸内切酶、T4 DNA 连接酶均购自美国 NEB 公司; 2 mm 电转杯购自美国 BIO-RAD 公司。

1.1.4 主要仪器 恒温振荡摇床购自太仓市实验设备厂; PE-2400 PCR 扩增仪购自美国 PE 公司; Scp85H 高速冷冻离心机购自日本 HITACHI 公司; SpectroPlus 全自动酶联免疫检测仪购自美国 MD 公司; GenePulser Xcell 电穿孔仪购自美国 BIO-RAD 公司。

1.2 方法

1.2.1 构建 z4832 打靶片段 以提取的 EHEC O157 : H7 EDL933 菌株基因组作为模板, 以 U1-Hind III 和 U2-Sal I 为引物 PCR 扩增 z4832 基因上游的 500 bp 同源臂序列, 以 D1-BamH I 和 D2-EcoR I 为引物 PCR 扩增 z4832 基因下游的 500 bp 同源臂序列。用 PCR 产物纯化试剂盒纯化回收 PCR 产物, 然后与克隆载体 pEASY-T1 simple 连接, 分别获得 pEASY-T1-z4832-up 质粒和 pEASY-T1-z4832-down 质粒; 将两种质粒以及 pUC19-kana 分别转化入大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞。分别构建 pEASY-T1-z4832-up/DH5 α 、pEASY-T1-z4832-down/DH5 α 、pEASY-T1-kana/DH5 α 菌株, 并从中提取 pEASY-T1-z4832-up 质粒、pEASY-T1-z4832-down 质粒、pUC19-kana 质粒。

用 Hind III 和 Sal I 限制性内切酶双酶切 pEASY-T1-z4832-up 质粒; BamH I 和 EcoR I 限制性内切酶双酶切 pEASY-T1-z4832-down 质粒; Sal I 和 BamH I 限制性内切酶双酶切 pUC19 质粒。上下游同源臂分别连接至 kana 的两侧, 构建 pUC19-z4832-up-kana-z4832-down 质粒。提取该质粒, 用引物 U1-Hind III 和 D2-EcoR I 扩增 UKD 打靶片段, 用 Dpn I 内切酶处理, 纯化回收, 获得线性打靶片段。

1.2.2 pKD46 质粒导入 EHEC O157 : H7 将 EHEC O157 : H7 菌株接入新鲜的 LB 培养基中培养过夜, 复苏菌株。将复苏的 EHEC O157 : H7 按 1 : 100 的比例接入 10 ml 新鲜 LB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 条件下培养至光密度 (optical density, OD) 值 OD_{600 nm} 约为 0.4 时取出, 冰浴 10 min。4000 r/min、4 $^{\circ}$ C 条件下离心 2 min, 富集菌体。用冰冷的 10% 甘油洗涤 3 次菌体, 每次离心条件均为 4000 r/min、4 $^{\circ}$ C、2 min。将菌体溶解到 100 μ l 10% 甘油中制成感受态细胞。向感受态细胞中加入 pKD46 质粒 2.5 kv、200 Ω 、25 μ F 电击, 然后加入 1 ml 冰冷的 LB 培养基。将电转杯封口, 在 30 $^{\circ}$ C、200 r/min

条件下培养 1 h, 取 500 μ l 菌体涂于含 100 μ g/ml 氨苄青霉素的 LB 平板, 30 $^{\circ}$ C 培养, 次日挑取单克隆, 经 PCR 鉴定构建 pKD46/EHEC 菌株。

1.2.3 z4832 目的基因的敲除 将 pKD46/EHEC 菌株于 30 $^{\circ}$ C、200 r/min 过夜复苏。次日按 1 : 100 的比例转接于 10 ml 新鲜 LB 培养基中 30 $^{\circ}$ C、200 r/min 培养, 待菌液 OD_{600 nm} 到达 0.3 时, 添加 L-阿拉伯糖至终浓度为 30 mmol/L, 继续培养 1 h, 待 OD_{600 nm} 约为 0.6 时取出。冰浴 10 min, 4 $^{\circ}$ C、5000 r/min 离心 2 min 收集菌体。相同的离心条件下用蒸馏水洗菌体 3 遍, 10% 甘油洗 3 遍, 最后用 100 μ l、10% 甘油重悬菌体, 4 $^{\circ}$ C 放置 15 min 即制得感受态细胞。向感受态细胞中加入 100 ng 纯化后的线性打靶片段, 混匀后冰浴 15 min, 然后将混合物转移至预冷的电转杯中, 在电压 2.5 kV, 电阻 200 Ω , 频率 25 μ F 条件下电击。电击后加入 1 ml 冰冷的 LB 培养基, 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 条件下培养 1 h。吸取 500 μ l 菌液涂布含 50 μ g/ml 卡那霉素的 LB 平板, 37 $^{\circ}$ C 培养过夜。次日挑取单克隆, U1-Hind III 和 D2-EcoR I 引物 PCR 鉴定打靶片段正确重组菌即为目的基因缺失的阳性克隆, 其中 kana 基因置换 z4832 基因。

1.2.4 卡那霉素抗性基因的消除 将已经敲除目的基因的阳性克隆传代 3 次, 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 培养, 待菌液 OD_{600 nm} 到达 0.6 时, 按照 1.2.3 中方法制备感受态细胞, 加入 200 ng pCP20 质粒, 冰浴 15 min, 然后电击转化, 电击之后立刻加入 1 ml 冰冷的 LB 培养基。封闭电转杯, 30 $^{\circ}$ C、200 r/min 培养 1 h。取 200 μ l 菌液涂布含 100 μ g/ml 氨苄霉素的 LB 平板, 30 $^{\circ}$ C 倒置培养过夜, 次日挑取单克隆, U1-Hind III 和 D2-EcoR I 引物鉴定阳性克隆, 将卡那抗性基因丢失的阳性克隆转接于新鲜 LB 培养基中, 42 $^{\circ}$ C、200 r/min 继续培养过夜, 次日将菌液适当稀释后涂布 LB 平板, 37 $^{\circ}$ C 培养过夜。挑取单克隆分别在含 100 μ g/ml 氨苄霉素的 LB 平板和 50 μ g/ml 卡那霉素 LB 平板上划线培养。对在两种含抗生素的平板上均不生长的克隆, 进行基因组定位测序。其中不具有 pKD46 和 pCP20 质粒的菌株即为 z4832 基因缺失突变株。

1.2.5 野生株及缺失突变株生长曲线的测定 将过夜培养的 EHEC O157 : H7 野生株和 z4832 基因缺失突变株按 1 : 100 的比例接种至 200 ml 培养瓶中, 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 培养。每隔 1 h 测定 1 次 OD_{600 nm}。每株菌做 3 个平行。将所得数据绘成生长曲线。

1.2.6 野生株及缺失突变株在含氧氟沙星的 M9 和 LB 培养基中存活率的测定 将 EHEC O157 : H7 野生株和 z4832 基因缺失突变株复苏后按 1 : 100 接种到 5 ml LB 或 M9 培养基内。37 °C、200 r/min 摇至 OD_{600 nm} 约为 0.5 时取出 500 μl 加入到 500 μl 含 10 μg/ml 氧氟沙星的 LB 或 M9 培养基内 37 °C、200 r/min 培养 5 h 后取出, 13 000 r/min 离心 5 min, 收集所有菌液。PBS 洗 1 次后, 取适量稀释后涂 LB 平板, 37 °C 培养 16 h, 每个浓度和稀释度各 3 个平行。根据平板上的细菌克隆数计算存活率。只取其中克隆数在 10 到 100 个之间的平板计数。

2 结果

2.1 PCR 扩增 z4832 基因上下游同源臂 PCR 扩增 z4832 基因上游 500 bp 同源臂 z4832-up 和下游 500 bp 同源臂 z4832-down(图 1A); 分别酶切连接于 pUC19-kana 质粒 kana 基因的两侧, 构建 pUC19-z4832-up-kana-z4832-down, 用引物 U1-Hind III 和 D2-EcoR I 扩增出打靶片段(图 1B)。

2.2 PCR 鉴定目的基因缺失突变株 挑取转化打靶片段后的单克隆, 以引物 U1-Hind III 和 D2-EcoR I 鉴定重组菌, 正确重组菌 PCR 产物大小为 2 500 bp(图 1C)。

2.3 卡那基因的敲除及鉴定 以 U1-Hind III 和 D2-EcoR I 为引物鉴定 kana 基因敲除突变株。pCP20 质粒表达的 FLP 重组酶识别 kana 基因两端的 FRT 位点, 敲除 kana 基因, PCR 产物大小约 1 000 bp(图 1D)。

2.4 野生株及 z4832 缺失突变株生长曲线的比较 每隔 1 h 测定菌液的 OD_{600 nm}, 监测 10 h, 绘制生长曲线, z4832 缺失突变株与野生株生长速度差异无统计学意义。见图 2。

2.5 野生株及 z4832 缺失株在含氧氟沙星的 M9

和 LB 培养基中存活率的比较 在含有氧氟沙星的 LB 培养基中 z4832 基因缺失株存活率比野生株高 4.3 倍, 两者存活率差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 3。而在含有氧氟沙星的 M9 培养基中 z4832 基因缺失株存活率比野生株低 4 倍, 两者存活率差异有统计学意义($P < 0.05$)。见图 4。

3 讨论

在病原微生物研究中基因敲除是确定基因未知功能和阐明其致病机制的一种重要手段。目前 Red 同源重组技术已经被广泛的应用于大肠杆菌的基因敲除, 该技术有同源序列短、重组效率高等特点, 可在 DNA 靶标分子的任意位点进行基因敲除、敲入、点突变等操作。本研究利用该技术成功构建了 EHEC O157 : H7 的 z4832 基因缺失突变株, 并且对传统的操作方法做了一些改进。感受态的制备采用现用现制备的方案, 制好后 4 °C 静置 15 min 后使用, 此时感受态细胞活力最佳, 使转化效率提高; 电击转化之前的操作使用 4 °C 预冷的枪头能够防止感受态细胞升温, 保持其活力; 阿拉伯糖终浓度为 30 mmol/L, 诱导时间为 60 min, 能够提高重组酶表达量; 在卡那霉素基因替换目标基因后, 将细菌传代 3 次有利于之后卡那霉素基因的去除。

GNAT 家族与许多生理反应相关, 包括耐药、转录调控、压力反应以及代谢等, 其可以利用乙酰辅酶 A 乙酰化各自的底物并释放辅酶 A 和乙酰化的产物^[11]。通过测定生长曲线发现 z4832 基因缺失后 EHEC O157 : H7 生长速度与野生株相比并无显著差异, 说明其表达产物作为乙酰转移酶在细菌生理进程中的作用与生长速度无关, z4832 基因的缺失并不会影响细菌的正常生长。

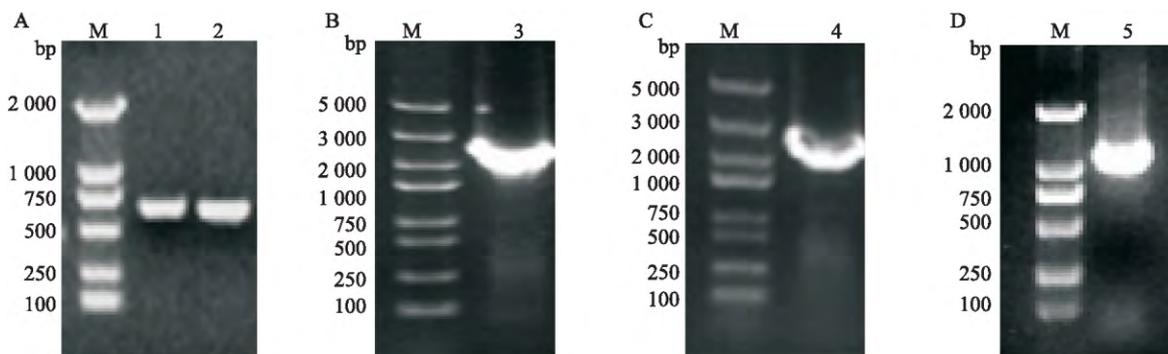


图 1 PCR 产物电泳结果

M: DNA 相对分子质量标志物; 1: z4832-up; 2: z4832-down; 3: PCR 扩增的打靶片段; 4: 打靶片段正确重组克隆; 5: 敲除 kana 基因的重组克隆; A: PCR 扩增 z4832 基因上下游同源臂; B: PCR 扩增打靶片段; C: PCR 鉴定打靶片段正确重组克隆; D: 卡那基因的敲除鉴定

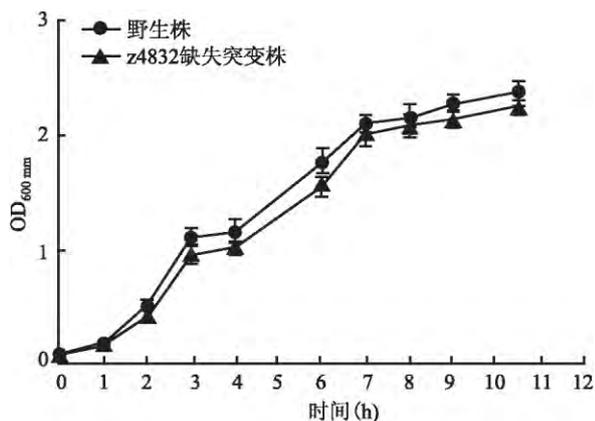


图2 野生株及 z4832 缺失突变株生长曲线

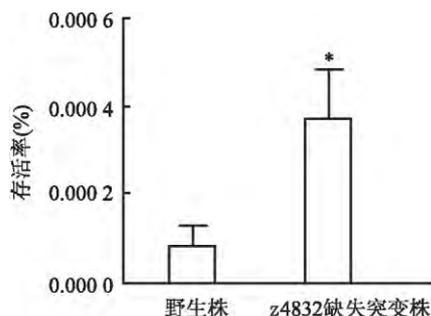


图3 野生株及 z4832 缺失突变株在含有氧氟沙星的 LB 培养基中的存活率
与野生株比较: * P < 0.05

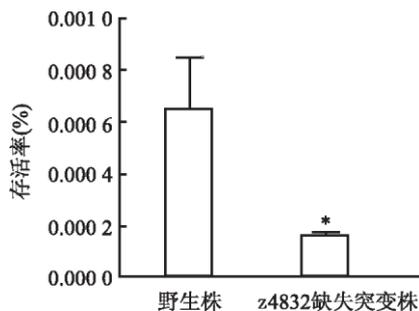


图4 野生株及 z4832 缺失突变株在含有氧氟沙星的 M9 培养基中的存活率
与野生株比较: * P < 0.05

在含有氧氟沙星的 LB 培养基中 z4832 基因缺失突变株存活率高于野生株,而在含有氧氟沙星的 M9 培养基中 z4832 基因缺失突变株存活率却低于野生株。两者结果截然不同,说明不同的碳源影响

了乙酰转移酶的作用结果,进一步推测该乙酰转移酶可能与细菌的代谢相关,其具体的作用机制将在后续工作中进一步探索。本实验构建的 EHEC O157:H7 的 z4832 基因缺失突变株为下一步机制研究提供了材料和依据。

参考文献

[1] Munns K D, Selinger L B, Stanford K, et al. Perspectives on super-shedding of *Escherichia coli* O157:H7 by cattle [J]. *Foodborne Pathog Dis* 2015, 12(2): 89-103.

[2] 陈爱林, 孟祥升, 刘宏祥, 等. 肠出血性大肠杆菌 O157:H7 毒力因子研究进展 [J]. *中国畜牧兽医文摘* 2012, 28(12): 47-8.

[3] 崔强, 周志江, 刘建青, 等. 肠出血性大肠杆菌粘附机理的研究进展 [J]. *中国人兽共患病学报* 2012, 28(8): 841-5.

[4] Greer C B, Tanaka Y, Kim Y J, et al. Histone deacetylases positively regulate transcription through the elongation machinery [J]. *Cell Rep* 2015, 13(7): 1444-55.

[5] Pan J, Chen R, Li C, et al. Global analysis of protein lysine succinylation profiles and their overlap with lysine acetylation in the *Marine Bacterium Vibrio parahaemolyticus* [J]. *J Proteome Res*, 2015, 14(10): 4309-18.

[6] Park J M, Jo S H, Kim M Y, et al. Role of transcription factor acetylation in the regulation of metabolic homeostasis [J]. *Protein Cell* 2015, 6(11): 804-13.

[7] Xie L, Zeng J, Luo H, et al. The roles of bacterial GCN5-related N-acetyltransferases [J]. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 2014, 24(1): 77-87.

[8] Tucker A C, Escalante-Semerena J C. Acetoacetyl-CoA synthetase activity is controlled by a protein acetyltransferase with unique domain organization in *Streptomyces lividans* [J]. *Mol Microbiol*, 2013, 87(1): 152-67.

[9] You D, Yao L L, Huang D, et al. Acetyl coenzyme A synthetase is acetylated on multiple lysine residues by a protein acetyltransferase with a single Gen5-type N-acetyltransferase (GNAT) domain in *Saccharopolyspora erythraea* [J]. *J Bacteriol* 2014, 196(17): 3169-78.

[10] Thao S, Escalante-Semerena J C. Control of protein function by reversible Nε-lysine acetylation in bacteria [J]. *Curr Opin Microbiol* 2011, 14(2): 200-4.

[11] Ma Q, Wood T K. Protein acetylation in prokaryotes increases stress resistance [J]. *Biochem Biophys Res Commun* 2011, 410(4): 846-51.

Construction of z4832 defective mutant of enterohemorrhagic *Escherichia coli*

Tan Linlin^{1,2}, Wang Jianxin², Li Tao², et al

(¹Anhui Medical University, Hefei 230032; ²State Key Laboratory of Pathogen and

Biosecurity Institute of Microbiology and Epidemiology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071)

Abstract Objective To construct acetyltransferase defective mutant of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157

网络出版时间: 2016-6-22 14:44:58 网络出版地址: http://www.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20160622.1444.018.html

自噬在内质网应激诱导的肝星状细胞凋亡中的作用研究

汪应红¹, 王欢¹, 左龙泉¹, 王亚飞², 黄涛², 范宇哲², 李凡杰², 王旭东², 黄艳¹

摘要 目的 研究内质网应激诱导 HSC 凋亡的过程中自噬的发生与否及其作用, 为肝纤维化的逆转提供新的思路。方法 采用血小板衍生生长因子(PDGF-BB)诱导大鼠肝星状细胞系 HSC-T6 活化模型, 在此基础上, 给予 ERS 诱导剂毒胡萝卜素(TG)刺激 24 h, Western blot 法检测自噬相关蛋白 LC3B 的表达, MDC 染色法观察自噬小体的生成, 观察 TG 对 HSC 自噬的影响, 进一步采用 3-MA 阻断自噬, 流式细胞术检测各组细胞凋亡率, 观察自噬在内质网应激诱导的肝星状细胞凋亡中的作用。结果 TG 可以诱导 HSC 凋亡, 伴随着自噬的发生, 用 3-MA 阻断自噬可以增强 TG 诱导的 HSC 凋亡。结论 内质网应激诱导 HSC 凋亡的过程伴随自噬, 阻断自噬可以增强内质网应激诱导的 HSC 凋亡。

关键词 内质网应激; 自噬; 肝星状细胞; 肝纤维化; 凋亡

中图分类号 R 966

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2016)08-1115-05

肝纤维化是肝脏对各种慢性损伤的修复反应, 是受到各种致病因子的侵袭所致的慢性炎症性疾病

2016-04-19 接收

基金项目: 安徽省学术技术带头人后备人选课题(编号: 2015H040); 安徽省高校优秀青年人才支持计划重点项目(编号: gxyqZD2016049); 安徽医科大学“青年拔尖人才支持计划”; 安徽医科大学临床医学“5+3”一体化专业学生“早期接触科研”训练计划项目(编号: 2015-ZQKY-46)

作者单位: 安徽医科大学¹药学院基础与临床药理教研室、²第二临床医学院, 合肥 230032

作者简介: 汪应红, 男, 硕士研究生;

黄艳, 女, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: aydhy@126.com

病, 本质是 Collagen I 等细胞外基质(extracellular matrix, ECM)相关主要成分的大量累积^[1]。研究^[2]表明静止的肝星状细胞(hepatic stellate cell, HSC)活化增殖、大量过度分泌 ECM 是导致肝纤维化发生的主要原因。因此, 促进活化的 HSC 发生凋亡是一种有效的肝纤维化防治方法。内质网应激(endoplasmic reticulum stress, ERS)是内质网功能紊乱导致的内质网未折叠和错误折叠蛋白的累积、细胞内钙离子平衡失调^[3-4]。内质网应激所诱导的细胞凋亡是最近几年才被了解的一种新的凋亡途径, 与经典的线粒体和死亡受体介导的细胞凋亡明显不同。目前已知由 ERS 激活凋亡的路径有三条: ①通过 PERK/eIF2 α 路径激活 CHOP 基因的转录, 下调抗凋亡基因 Bcl-2 的表达, 促进细胞凋亡; ②通过 IRE1 激活 JNK 信号通路下调抗凋亡基因 Bcl-2 的表达, 激活线粒体凋亡级联反应、上调促凋亡基因 Bim; ③ERS 特有的 Caspase-12 的激活, 进一步激活凋亡启动因子 Caspase-9 及凋亡执行因子 Caspase-3^[5]。ERS 通过减少未折叠或错误折叠蛋白沉积, 激活促凋亡信号通路, 被证实与许多疾病密切相关^[6]。前期研究^[7]显示 ERS 能够抑制活化的 HSC 分泌 α -平滑肌肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)和 I 型胶原(Collagen I, Col-I), 促进活化的 HSC 凋亡。自噬是一个细胞吞噬自身细胞质蛋白或细胞器, 使其进入囊泡, 并与溶酶体融合后形成自噬溶酶体的过程, 通过自噬溶酶体降解其所包裹的

: H7(EHEC O157:H7) with λ Red recombination system. **Methods** Kanamycin-resistant gene with two FRT sites and homologous regions which were cloned from EHEC O157:H7 by PCR were inserted into plasmid pUC19 to construct a recombinant vector. z4832 was deleted with the recombination function of plasmid pKD46. The kanamycin-resistant gene was deleted with the recombination function of plasmid pCP20. The gene deletion mutant was obtained and identified by PCR and sequencing. Then the growth curve was determined and the change of survival rate were checked in LB or M9 medium containing ofloxacin. **Results** The acetyltransferase gene z4832 defective mutant of EHEC O157:H7 was successfully constructed. The growth curve of the mutant had no significant difference with that of wild strain. The viability of deletion mutant increased in the culture with LB medium($P < 0.05$) but reduced with M9 medium($P < 0.05$). **Conclusion** The construction of z4832 defective mutant would be helpful for study of the effect of z4832 on antibiotic tolerance and the mechanism by which acetyltransferase works.

Key words EHEC O157:H7; λ Red recombinant system; acetyltransferase; antibiotics