

秀丽线虫中 *p53/cep-1* 基因克隆、表达及其对寿命的影响

苏小珊 杨玉荣*

(厦门大学生命科学学院, 厦门 361005)

摘要 *Caenorhabditis elegans* 中的 *cep-1* 基因与哺乳动物中的肿瘤抑制因子 *p53* 同源, 能够引发由 DNA 损伤导致的细胞凋亡。*cep-1* 基因与寿命的关系研究并不多。我们利用 *C.elegans* 的 cDNA 进行 PCR 扩增得到 *cep-1* 的片段并构建到表达载体以及 RNA 干扰载体上, 经过 IPTG 诱导表达得到了约 90kDa 的 CEP-1 融合蛋白。同时对 *C.elegans* 三种虫株: 野生型, *daf-2(e1370)*, *daf-16(e1038)* 进行 RNAi (RNA-mediated interference), 发现 *cep-1* RNAi 之后野生型的寿命显著延长, 另外两种虫株的寿命没有显著改变, 并以 RT-PCR 的方法检测了 *cep-1* 在这三种虫株中的表达情况。

关键词 *Caenorhabditis elegans*; *p53/cep-1*; 克隆; 表达; RNAi; 寿命

哺乳动物中的肿瘤抑制因子 *p53* 蛋白是一种具有特殊 DNA 结合序列的转录因子, 可以诱导细胞周期停滞以及引发由 DNA 损伤导致的细胞凋亡^[1]。在模式生物秀丽小杆线虫(*Caenorhabditis elegans*)中同样也有 *p53* 同源基因, 即 *cep-1*, 它和人的 *p53* 在整个序列上相似度并不高, 但是两个蛋白在整体结构域上却有相似的折叠^[2]。

秀丽小杆线虫的 *cep-1* 是普遍存在于胚胎当中, 能够引发由 DNA 损伤导致的细胞凋亡, 例如离子射线对 DNA 造成的损伤等^[3-6], 但是对于热激、饥饿、高氧以及渗透压的改变所导致的细胞凋亡却不依赖 *p53/cep-1* 途径^[7], 另外, 线虫的 *cep-1* 还参与调节线虫的生长发育速率以及生殖腺细胞的复制^[8,9]。

在果蝇中, *p53* 的同源物被抑制后将会使其寿命延长^[10], 于是我们用细菌介导的 RNAi (RNA-mediated interference) 的方法研究了线虫 *p53* 的同源物 *cep-1* 对三种虫株寿命的影响。细菌介导的 RNAi 原理是通过构建 RNAi 载体, 转化大肠杆菌 HT115, 该种细菌体内缺少 RNA 酶, 在 IPTG 诱导下可产生双链 RNA (double-stranded RNA; dsRNA), 将转化的细菌喂食线虫, 就可以介导线虫体内同源基因的 mRNA 降解, 从而导致该基因失活^[11]。构建 RNAi 所使用的 L4440 载体具有双 T7 启动子, 分别在插入基因片段的两端, 在 IPTG 的诱导下可以转录产生 dsRNA^[12], 从而对喂食细菌的线虫达到干扰的效果。我们将 *cep-1* 成功构建到 L4440 载体中, 通过喂食的方法对线虫进行 RNAi^[13]。

在线虫寿命的调控中, 类胰岛素(IGF-1)信号途径起了很重要的作用, 其中 *daf* (dauer formation) 基因 *daf-2* 编码一个类胰岛素受体, 调节内分泌信号, 同时调节线虫的一种选择性发育状态 dauer 的形成, 该基因突变以后会使线虫的寿命显著延长^[14,15], 而 *daf-16* 编码一个叉头蛋白转录因子, 是 DAF-2 途径中主要的靶目标, *daf-16* 的突变将使线虫寿命缩短^[16]。我们采用这两种突变型虫株作为研究对象, 同时以野生型 N2 作为参照, 发现 *cep-1* RNAi 后可以延长 N2 的寿命, 但是对于另外的两种突变株没有显著的影响。

本文报告了我们对秀丽小杆线虫 *cep-1* 基因的克隆和表达, 以及利用 RNAi 的方法研究了 *cep-1* 对线虫三种虫株寿命的影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验用的 *C.elegans* 虫株分别是野生型 N2、突变体 *daf-2(e1370)* 和 *daf-16(e1038)* 由 *Caenorhabditis Genetics Center* 提供, 本实验室保存。根据线虫培养的标准方法^[17], 配制 NGM 培养基, 以大肠杆菌 OP50 为食物在 15 °C 恒温培养箱中进行培养。实验所使用的菌株 *E.coli* DH5 α 、HT115、BL21 (DE3),

收稿日期: 2010-02-03 接受日期: 2010-05-27

国家自然科学基金(No.30972181)和厦门大学新世纪优秀人才支持计划资助项目

* 通讯作者。Tel: 0592-2181792, E-mail: yryang@xmu.edu.cn

质粒 pET-32a 和 L4440 由本实验室保存。pMD-18T 载体购于 TaKaRa 公司。

1.2 试剂药品

实验所用的 dNTP、PCR 缓冲液、Taq 酶、限制性内切酶、核酸分子量标准 GeneRuler DNA Ladder Mixture(分子量由上到下分别为: 10 000、8 000、6 000、5 000、4 000、3 500、3 000、2 500、2 000、1 500、1 200、1 000、900、800、700、600、500、400、300、200 和 100 bp)和蛋白分子量标准(分子量由上到下分别为: 117、66、45、35、25、18 和 14 kDa)购自 MBI Fermentas 公司; 辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗小鼠抗体: Pierce 公司; Tri reagent 购自 Molecular Research Center, Inc 公司; 反转录试剂盒购于 TaKaRa 公司; 其他试剂均为国产分析纯产品; 引物 *cep-1* F (5'-CGC GGA TCC AGA ATG GAA CCC GAT GAT T-3')和 *cep-1* R (5'-CCG GAA TTC TTA GCG GTA AAA GCT GAG-3')由上海生工合成。

1.3 方法

1.3.1 *C.elegans* 总 RNA 的提取及反转录 将培养好的秀丽小杆线虫收集到 1.5 ml 离心管中, 加 1 ml Tri reagent 试剂研磨, 按照提取试剂说明书进行操作, 最后用 1% 的琼脂糖凝胶电泳验证。以秀丽小杆线虫总 RNA 为模板进行反转录, 体系如下: 总 RNA 9 μ l, Oligo (dT) 1 μ l, DEPC 水 2 μ l, 混合后 70 $^{\circ}$ C 孵育 5 min 后置于冰上; 在以上混合物中加入 5 \times Reaction buffer 4 μ l, 10 mmol/L dNTP mixture (10 mmol/L) 2 μ l, RNase inhibitor 1 μ l, 混匀后 37 $^{\circ}$ C 反应 5 min 后置冰上; 加入 Reverse Transcriptase M-MLV (RNase H-) 1 μ l, 总体积为 20 μ l。42 $^{\circ}$ C 孵育 90 min。

1.3.2 *C.elegans* 中 *cep-1* 基因的 cDNA 扩增和克隆 *cep-1* 的 cDNA 扩增体系如下: cDNA 模板 2 μ l, PCR mixture 10 μ l, 引物 *cep-1* F 2.5 μ l, *cep-1* R 2.5 μ l, Taq 酶 0.25 μ l, ddH₂O 32.75 μ l, 总体积 50 μ l。反应如下: ①95 $^{\circ}$ C 5min, ②95 $^{\circ}$ C 30s, 50.6 $^{\circ}$ C 35 s, 72 $^{\circ}$ C 2 min; 共 40 cycles, ③72 $^{\circ}$ C 8 min, ④保持在 4 $^{\circ}$ C。取 5 μ l PCR 产物电泳检查扩增结果, 将其余的目的条带电泳割胶回收。

将 *cep-1* cDNA PCR 回收产物 7 μ l、pMD18-T 载体(克隆试剂盒)0.25 μ l、连接 buffer 2.5 μ l, 16 $^{\circ}$ C 连接 14 h。取连接产物转化入 *E.coli* DH5 α 感受态细菌中, 冰上放置 30 min, 42 $^{\circ}$ C 水浴 90 s, 冰上放置 1~2 min, 加 150 μ l 的 LB 液体培养基于 37 $^{\circ}$ C 摇床缓

慢摇 45 min, 涂含 Amp 的 LB 平板, 37 $^{\circ}$ C 培养过夜。在平板上挑取单菌落, PCR 筛选阳性克隆。碱裂解法进行质粒提取, *EcoR* I 和 *BamH* I 双酶切验证后送去上海英俊公司测序。

1.3.3 表达载体的构建及表达 将测序正确且方向正置的 *cep-1*-pMD 质粒以及 pET-32a 载体用 *BamH* I 和 *EcoR* I 双酶切, 回收片段, 将两者用 T4 连接酶进行连接。连接体系: 回收的 *cep-1* 片段 7 μ l、PET-32a 回收产物 1 μ l、T4 ligase 1 μ l、T4 ligase buffer 1 μ l, 16 $^{\circ}$ C 连接过夜。转化入 50 μ l 大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 提取质粒、酶切、PCR 鉴定。将鉴定正确的 *cep-1*-pET-32a 质粒转化入 50 μ l 大肠杆菌 BL21 (DE3)感受态细胞, 提取质粒、酶切验证后送去测序。

将含有测序正确的质粒的菌液涂布于含氨苄青霉素 50 μ g/ml 的 LB 平板中, 于 37 $^{\circ}$ C 培养过夜。次日, 挑单菌落培养, 当 OD₅₅₀ 接近 0.6 时, 转入大瓶培养基中, 至 OD₅₅₀ 接近 0.8 时, 加入 IPTG 至终浓度 1 mmol/L, 在 25 $^{\circ}$ C 培养 6 h, 收菌。用 1 \times 加样缓冲液裂解, 沸水中煮 5 min。10 000 rpm 离心 1 min, 收集上层菌裂解液进行 SDS-PAGE 电泳分析。

1.3.4 干扰载体的构建及干扰菌的制备 我们采取 Andrew Fire 实验室的双 T7 promoter 载体的方法进行 RNA 干扰载体的构建。将测序正确的 *cep-1*-pMD 质粒和 L4440 载体用 *Sma* I 和 *Hind* III 双酶切, 回收片段进行连接。连接体系同上。转化入 50 μ l 大肠杆菌 HT115 感受态细胞。提取质粒, 酶切鉴定正确后, 送去测序。

1.3.5 *cep-1* RNAi 方法及寿命分析 用裂解液处理 *C.elegans* 怀卵成虫, 将所得卵移至加有干扰菌的含 100 mg/ml FU、50 mg/ml 氨苄青霉素以及 1 mmol/ml IPTG 的 NGM 平板上。培养到 L4 幼虫时, 将虫子挑到新的含有干扰菌的平板上, 每个板 60 条虫, 各做两个平行组, 每种虫株观察总数约为 120 条, 放于 25 $^{\circ}$ C 恒温箱中培养, 每天统计死亡数目。以喂食含 L4440 空载体的 HT115 (L4440)细菌的线虫作为对照。用 SPSS 软件进行数据处理和 *P* 值分析, 用 Excel 制图。

1.3.6 半定量 RT-PCR 检测 *cep-1* 在三种虫株中的表达 收集 N2、*daf-2* (*e1370*)和 *daf-16* (*e1038*)三种虫株, 按照上述实验步骤提取 RNA 进行 RT-PCR。三种虫株 cDNA 模板各 0.5 μ l, *cep-1* F 和 *cep-1* R 引物各 2 μ l, 同时加入 *actin* F 和 *actin* R 各 1 μ l。10 \times 反应缓冲液 5 μ l, 2.5 mmol/L dNTPs 5 μ l, 5 U/ μ l Taq

酶 0.25 μ l, 加双蒸水至反应总体积为 50 μ l。PCR 反应程序为: 第一次 PCR: ① 95 $^{\circ}$ C 5 min, ② 95 $^{\circ}$ C -30 s, ③ 55 $^{\circ}$ C 30 s, ④ 72 $^{\circ}$ C 2 min, 由②到④ 25 个循环, ⑤ 72 $^{\circ}$ C 7 min, ⑥ 保持 4 $^{\circ}$ C。取出 10 μ l 后, 剩余样品继续第二次 PCR: ① 95 $^{\circ}$ C 5 min, ② 95 $^{\circ}$ C 30 s, ③ 55 $^{\circ}$ C 30 s, ④ 72 $^{\circ}$ C 2 min, 由②到④ 5 个循环, ⑤ 72 $^{\circ}$ C 7 min, ⑥ 保持 4 $^{\circ}$ C。取出 10 μ l 后, 按上述步骤继续, 直到总共运行完四十个循环后停止, 跑电泳检测。

2 结果

2.1 *C.elegans* 中 *cep-1* 基因的克隆

根据 Genbank 公布的 *cep-1* 序列设计引物, 以线虫 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, 得到一条约 1 900 bp

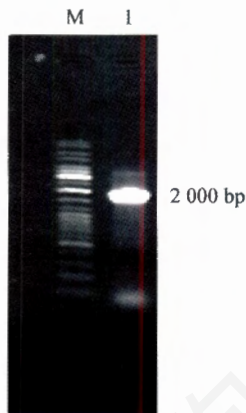


Fig.1 Amplification of *C.elegans cep-1* cDNA

M: gene ruler DNA ladder mixture; 1: amplification of *C.elegans cep-1* cDNA.

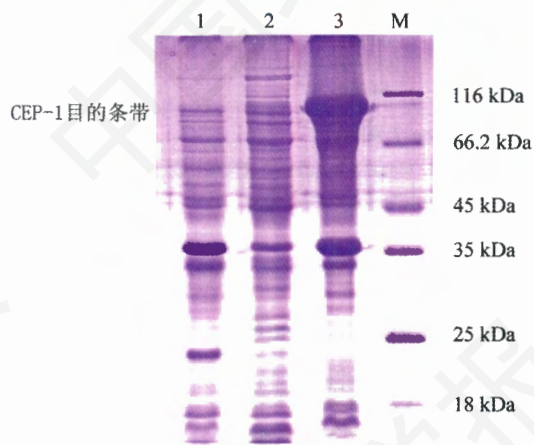


Fig.3 Expression of CEP-1 analyzed by SDS-PAGE

M: protein molecular standard marker; 1: control; 2: expression of CEP-1 without IPTG induced; 3: expression of CEP-1 with IPTG induced.

目的条带(图 1), 经克隆、酶切鉴定和测序、Blast 比对确定为 *C.elegans* 的 *cep-1* 基因全长 cDNA。

2.2 CEP-1 蛋白的表达

将 *cep-1*-pMD 与 pET-32a 载体同时进行双酶切, 回收片段后用 T4 连接酶连接, 之后进行转化, 挑选阳性克隆, 摇菌提质粒酶切验证(图 2), 结果与连进去的片段大小一致, 测序结果也正确。之后将重组质粒转入 BL21 (DE3) 中, 在 IPTG 诱导下表达出 90 kDa 左右的融合蛋白(图 3)。

2.3 *cep-1* RNAi 载体的构建以及干扰对 *C.elegans* 寿命的影响

将 *cep-1* 构建到 L4440 干扰载体上, 酶切验证及测序结果正确后(图 4)转化至 HT115 感受态中制备成干扰菌喂食 *C.elegans* 三种虫株, 即野生型 N2, 突变



Fig.2 *cep-1*-pET-32a digestion with *Bam*H I and *Eco*R I

M: gene ruler DNA ladder mixture; 1: *cep-1*-pET-32a digestion with *Bam*H I and *Eco*R I.



Fig.4 Restriction enzyme digestion of *cep-1*-L4440

M: gene ruler DNA ladder mixture; 1: *cep-1*-L4440 cut with *Sma* I and *Hind* III.

株 *daf-2 (e1370)* 和 *daf-16 (e1038)*, 同时以喂食含有 L4440 空载体的 HT115 作为对照, 然后观察其寿命的变化。 *daf-2 (e1370)* 突变株是寿命延长型, *daf-16 (e1038)* 突变株是寿命缩短型, 但是结果发现只有 N2 的寿命延长了 8.32% (表 1), 其他两种虫株并未有显著变化 (图 5)。

2.4 RT-PCR 检测 *cep-1* 在三种虫株的表达情况

通过 RT-PCR 的方法检测了 *cep-1* 在 N2、*daf-16 (e1038)* 和 *daf-2 (e1370)* 虫株的表达情况, 同时以 *actin* 基因作为内参确保了三种模板量的一致性。图 6 分别展示了 25、30、35、40 个循环下的三种虫株内 *cep-1* 的表达情况。从图中可以看出, *cep-1* 在 N2、*daf-16 (e1038)* 中的表达量基本一致, 而在 *daf-2 (e1370)* 中则比其余两种少。

Table 1 The effect of *cep-1* RNAi on lifespan

Genotype	RNAi	Availability/total	Times	Mean lifespan	P value (vs control)
N2	Control	118/120	2	13.839±0.224	P<0.001**
	<i>cep-1</i> RNAi	110/120	2	14.991±0.227	
<i>daf-16(e1038)</i>	Control	116/120	2	14.138±0.232	P=0.909
	<i>cep-1</i> RNAi	118/120	2	14.144±0.222	
<i>daf-2(e1370)</i>	Control	114/120	2	24.246±0.573	P=0.417
	<i>cep-1</i> RNAi	116/120	2	24.552±0.453	

**P<0.001: significant difference; P>0.05: no difference.

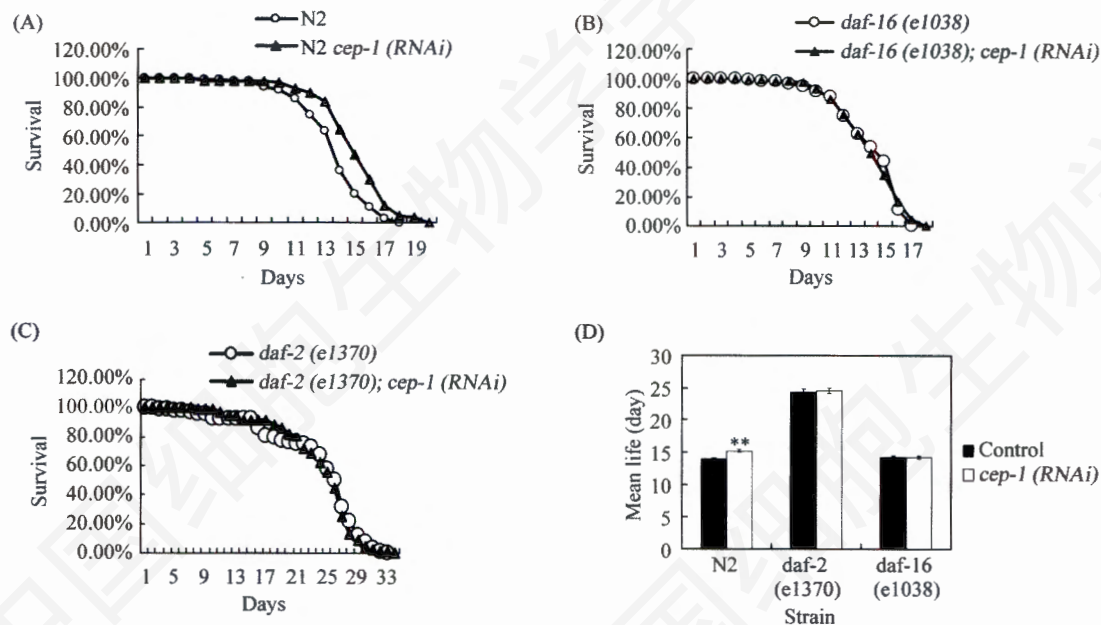


Fig.5 Survival rate of *C.elegans* treated by *cep-1* RNAi

A: survival rate of wild type N2 treated by *cep-1* RNAi; B: survival rate of *daf-16(e1038)* treated by *cep-1* RNAi; C: survival rate of *daf-2 (e1370)* treated by *cep-1* RNAi; D: mean lifespan of three strains by *cep-1* RNAi. **: significant difference.

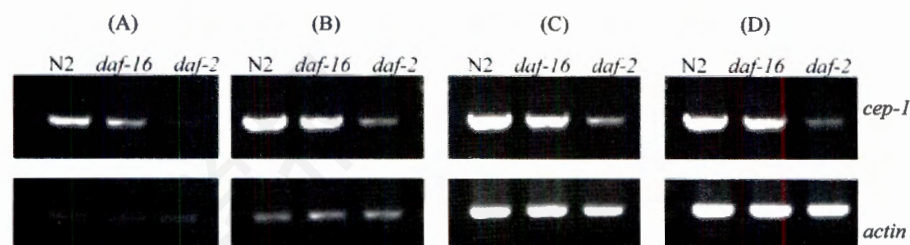


Fig.6 *cep-1* transcription level in N2, *daf-16(e1038)* and *daf-2(e1370)* detected by RT-PCR

A: *cep-1* mRNA was detected by RT-PCR with 25 cycles. *actin* was amplified as the control; B: 30 cycles; C: 35 cycles; D: 40 cycles.

3 讨论

根据目前的研究, 已知 *C.elegans* 中 *p53/cep-1* 基因参与细胞周期停滞、DNA 损伤引起的细胞凋亡以及调节生长发育速率和生殖腺发育等^[4,8,18], 因此 *p53/cep-1* 对线虫的寿命也具有一定的影响。我们根据 *C.elegans* 中 *cep-1* 的序列设计引物, 克隆得到正确的 *cep-1*, 并将其成功构建到表达载体和干扰载体上, 诱导表达出 CEP-1 融合蛋白, 大小与根据序列预测的一致, 得到蛋白后可以免疫小鼠以获得抗体, 继而进行后续的实验。另外, 我们还利用 RNAi 技术研究了 *cep-1* RNAi 对线虫寿命的影响。

线虫寿命的调节方式通常由 DAF-2 介导的类胰岛素途径进行^[15], 因此在研究 *cep-1* 对线虫寿命的影响时, 我们采用 RNAi 技术对野生型 N2 进行 *cep-1* RNAi 发现其寿命显著延长, 为了进一步验证这种延长的效应是否通过 DAF-2 途径, 我们选用两种突变株 *daf-2 (e1370)* 和 *daf-16 (e1038)* 进行相同的 *cep-1* RNAi, 结果发现与对照相比其寿命并没有显著改变。半定量 RT-PCR 检测 *cep-1* 在三种虫株中的表达发现: *cep-1* 在野生型 N2 和 *daf-16 (e1038)* 突变体中的表达水平一致, *daf-16* 突变不影响 *cep-1* 的表达; 而 *daf-2* 突变则使 *cep-1* 的表达水平降低, 说明 *daf-2* 对 *cep-1* 的表达有影响, *daf-2* 是 *cep-1* 表达所需要的。在 *daf-2* 缺失的情况下, *cep-1* RNAi 也不能使其寿命延长也证明了这一观点。因此我们认为 *cep-1* 对寿命的延长效应不依赖 DAF-16, 但 *daf-2* 对 *cep-1* 的表达是有影响的。

另外, 根据目前的报道, *cep-1* 对线虫寿命的调节可以通过感知线粒体不同损伤的情况来延长或缩短寿命, 线粒体损伤程度较轻导致的寿命延长是以一种 *cep-1* 依赖的方式, 但独立于 DNA 损伤引起的凋亡途径; 严重的线粒体损伤需要 *cep-1/egl-1* 途径来缩短寿命以及使发育停滞^[19]。这一研究说明了 *cep-1* 在调节寿命上另有途径, 同时也表明 *cep-1* 与能量代谢有关。因此, 我们认为 *daf-2* 对 *cep-1* 有作用, 但在延长寿命上不依赖 *daf-16*。

本文的创新性在于克隆表达了 *cep-1* 并成功地获得了 CEP-1 蛋白, 为了验证 *cep-1* 对线虫寿命的影响是否经过 DAF-2 途径, 采用 RNAi 干扰 *daf-2 (e1370)* 和 *daf-16 (e1038)* 两种虫株, 同时用半定量 RT-PCR 检测 *cep-1* 在三种虫株中的表达情况, 结果证明在 *daf-2* 存在的情况下 *cep-1* 对线虫寿命的延长效应才会发生, *daf-2* 突变则 *cep-1* 对线虫寿命的延长效应就消

失。另外, 目前已有关于 *cep-1* 与能量代谢有关的研究报道^[19], 以后的研究重点可放在 *cep-1* 与能量代谢相关基因之间的相互作用上。

参考文献(References)

- 1 Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. *Nature* 2000; 408 (6810): 307-10.
- 2 Huyen Y, Jeffrey PD, Derry WB, Rothman JH, Pavletich NP, Stavridi ES, et al. Structural differences in the DNA binding domains of human p53 and its *C. elegans* ortholog *cep-1*. *Structure* 2004; 12 (7): 1237-43.
- 3 Garcia-Muse T, Boulton SJ. Distinct modes of ATR activation after replication stress and DNA double-strand breaks in *Caenorhabditis elegans*. *EMBO J* 2005; 24 (24): 4345-55.
- 4 Schumacher B, Hofmann K, Boulton S, Gartner A. The *C. elegans* homolog of the p53 tumor suppressor is required for DNA damage-induced apoptosis. *Curr Biol* 2001; 11 (21): 1722-7.
- 5 Derry WB, Putzke AP, Rothman JH. *Caenorhabditis elegans p53*: role in apoptosis, meiosis, and stress resistance. *Science* 2001; 294 (5542): 591-5.
- 6 Kim YM, Yang I, Lee J, Koo HS. Deficiency of Bloom's syndrome protein causes hypersensitivity of *C. elegans* to ionizing radiation but not to UV radiation, and induces p53-dependent physiological apoptosis. *Mol Cells* 2005; 20 (2): 228-34.
- 7 Salinas LS, Maldonado E, Navarro RE. Stress-induced germ cell apoptosis by a p53 independent pathway in *Caenorhabditis elegans*. *Cell Death Differ* 2006; 13 (12): 2129-39.
- 8 Derry WB, Bierings R, van Iersel M, Satkunendran T, Reinke V, Rothman JH. Regulation of developmental rate and germ cell proliferation in *Caenorhabditis elegans* by the p53 gene network. *Cell Death Differ* 2007; 14 (4): 662-70.
- 9 Kudron MM, Reinke V. *C. elegans* nucleostemin is required for larval growth and germline stem cell division. *PLoS Genet* 2008; 4 (8): e1000181.
- 10 Bauer JH, Poon PC, Glatt-Deeley H, Abrams JM, Helfand SL. Neuronal expression of p53 dominant-negative proteins in adult *Drosophila melanogaster* extends life span. *Curr Biol* 2005; 15 (22): 2063-8.
- 11 Bass BL. Double-stranded RNA as a template for gene silencing. *Cell* 2000; 101 (3): 235-8.
- 12 Timmons L, Fire A. Specific interference by ingested dsRNA. *Nature* 1998; 395 (6705): 854.
- 13 Kamath RS, Martinez-Campos M, Zipperlen P, Fraser AG, Ahringer J. Effectiveness of specific RNA-mediated interference through ingested double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Genome Biol* 2001; 2 (1): RESEARCH0002.
- 14 Dorman JB, Albinder B, Shroyer T, Kenyon C. The *age-1* and *daf-2* genes function in a common pathway to control the lifespan of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 1995; 141 (4): 1399-406.
- 15 Kimura KD, Tissenbaum HA, Liu Y, Ruvkun G. *daf-2*, an insulin receptor-like gene that regulates longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 1997; 277 (5328): 942-6.
- 16 Lin K, Hsin H, Libina N, Kenyon C. Regulation of the

- Caenorhabditis elegans* longevity protein DAF-16 by insulin/IGF-1 and germline signaling. *Nat Genet* 2001; 28 (2): 139-45.
- 17 Brenner S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* 1974; 77 (1): 71-94.
- 18 Deng X, Hofmann ER, Villanueva A, Hobert O, Capodici P, Veach DR, et al. *Caenorhabditis elegans* ABL-1 antagonizes p53-mediated germline apoptosis after ionizing irradiation. *Nat Genet* 2004; 36 (8): 906-12.
- 19 Ventura N, Rea SL, Schiavi A, Torgovnick A, Testi R, Johnson TE. p53/CEP-1 increases or decreases lifespan, depending on level of mitochondrial bioenergetic stress. *Aging Cell* 2009; 8 (4): 380-93.
- 20 Hofmann ER, Milstein S, Boulton SJ, Ye M, Hofmann JJ, Stergiou L, et al. *Caenorhabditis elegans* HUS-1 is a DNA damage checkpoint protein required for genome stability and EGL-1-mediated apoptosis. *Curr Biol* 2002; 12 (22): 1908-18.

Cloning, Expressing of *Caenorhabditis elegans* p53/cep-1 and the Effect on Lifespan

Xiao-Shan Su, Yu-Rong Yang*

(School of Life Science, Xiamen University, Xiamen 361005)

Abstract *Caenorhabditis elegans cep-1* was similar to its mammalian counterpart, tumor suppressor *p53*. *cep-1* was amplified from *C.elegans* cDNA by PCR and cloned into expression vector and RNA interference vector. The full length of *cep-1* cDNA was 2106bp, containing a 5'untranslated region of 27 bp and a 3'untranslated region of 144 bp. The open reading frame was 1935bp which predicted encoding a 645 amino acids protein. CEP-1 recombinant protein was obtained by IPTG induced in *Escherichia coli*. At the same time, we investigated the effect of *p53/cep-1* on *C.elegans* lifespan in wild type, *daf-2 (e1370)*, *daf-16 (e1038)* strains by RNAi (RNA-mediated interference), and found that the lifespan of wild type was prolonged significantly in *cep-1* RNAi worm, in contrast, the lifespan of the other strains have no difference with the RNAi control worms. And the transcription level of *cep-1* in *N2*, *daf-2 (e1370)* and *daf-16 (e1038)* was determined by RT-PCR.

Key words *Caenorhabditis elegans*; p53/cep-1; cloning; expressing; RNAi; lifespan

Received: February 3, 2010 Accepted: May 27, 2010

This work was supported by the National Nature Science Foundation of China (No.30972181) and New Century Talents Support Program from Xiamen University to YRY

*Corresponding author. Tel: 86-592-2181792, E-mail: yryang@xmu.edu.cn