

百脉根泛素结合酶 LjE2 的表达及活性鉴定

刘超 冯勇 董笑笑 张忠明 朱辉

华中农业大学生命科学技术学院/农业微生物学国家重点实验室, 武汉 430070

摘要 为了研究泛素化作用在豆科植物共生固氮过程中的调控功能和作用机制, 利用拟南芥泛素结合酶 E2 的序列, 在百脉根基因组上鉴定得到 14 个编码 E2(LjE2)的基因, 从 *LjE2* 中克隆到 11 个基因并构建了融合表达载体 pET-*LjE2s*:His。通过大肠杆菌表达系统, 表达并纯化到 10 个 LjE2:His 融合蛋白。经体外泛素化及 Western blot 分析, 在 10 个 LjE2 中有 9 个具有泛素结合酶活性, 1 个(LjE2-5)未检测到泛素结合酶活性。

关键词 百脉根; 泛素结合酶; 体外泛素化; 原核表达系统

中图分类号 Q 939.9 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2019)01-0022-06

真核生物的 mRNA 翻译后的蛋白只是蛋白质前体, 必须经过一系列的修饰加工后才能成为成熟的蛋白质, 发挥相应的功能。泛素化是蛋白质翻译后的一种重要的修饰途径, 在真核生物基因组上存在大量编码参与泛素化相关酶类的基因^[1-3]。泛素化修饰几乎参与了真核生物所有的生命进程, 如细胞凋亡、细胞周期、免疫应答及 DNA 修复损伤、转录调节、信号转导等^[4-7]。典型的泛素化修饰包括 3 种酶即 E1 泛素激活酶 (ubiquitin-activating enzyme)、E2 泛素结合酶 (ubiquitin-conjugation enzyme)、E3 泛素连接酶 (ubiquitin-protein ligase) 和一种由 76 个氨基酸组成并高度保守的泛素 (ubiquitin, Ub)。E1 依赖 ATP 共价结合泛素 Ub, E2 将与 E1 结合的 Ub 传递给 E3 连接酶, E3 将 Ub 标记到底物的泛素化位点, 最后底物会通过 26S 蛋白酶体途径被降解或者被内吞转运^[8], 说明 E1 和 E2 功能相对比较保守, E3 则主要决定底物的特异性^[9]。由于 E2 在泛素化过程中控制多聚泛素化链的形成和组装, 并决定泛素链的拓扑结构^[10-12], 而不同的 E2/E3 组合也会导致底物发生不同的泛素化修饰^[13], 对 E2 的研究也受到了广泛的重视。

豆科植物能够和根瘤菌建立共生固氮体系^[14-16], 其中涉及复杂的分子调控网络^[17]。泛素化作为一种重要的蛋白修饰途径必然参与调控共生信

号。在百脉根 (*Lotus japonicus*) 中发现一个与共生受体激酶 SymRK 相互作用的 E3 泛素连接酶 (SIE3) 有泛素化 SymRK 功能并调控百脉根的结瘤数^[18]。另一种泛素连接酶 SINA4 也具有泛素化 SymRK 功能并阻碍根瘤菌的侵染过程^[19]。在蒺藜苜蓿 (*Medicago truncatula*) 中, 共生受体激酶 LYK3 和 DMI2 能够磷酸化泛素连接酶 PUB1。同时, PUB1 具有调控根瘤菌和 AM 真菌侵染的功能^[20]。然而, 目前在豆科植物体外泛素化实验中, 使用的 E1 和 E2 大部分来源于少数几种动/植物。考虑到 E2 和 E3 之间的特异性, 其他物种的 E1 尤其是 E2 已经不能满足豆科植物中的泛素化研究的需要。基于此, 本研究以百脉根为材料, 分离和鉴定出不同类型且具有活性的 E2, 为建立豆科植物体外泛素化检测系统提供材料。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验中克隆菌株为大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH10B, 表达菌株为 BL21(DE3), 载体为 pET28a(+) 和 pGEX-4T-1, 均来自华中农业大学农业微生物学国家重点实验室。分子克隆所用的限制性内切酶来源于 Fermentas 公司, DNA 聚合酶来源于 TaKaRa 公司。泛素化反应中使用的 E1、Buffer、ATP 均来

收稿日期: 2018-04-24

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31770265); 国家科技基础性工作专项 (2015FY110700); 中央高校基本科研业务费专项 (2662015PY230)

刘超, 硕士研究生。研究方向: 根瘤菌分子生物学。E-mail: 574404809@qq.com

通信作者: 朱辉, 副教授。研究方向: 共生固氮。E-mail: zhuhui@mail.hzau.edu.cn

源于 UBPBIO 公司。

1.2 原核系统表达蛋白

将构建好的融合表达载体转入表达菌株,挑取单克隆于适量液体 LB 中活化培养。在 OD₆₀₀ 达到 0.4~0.6 时,加入终浓度为 0.2 mmol/L 的 IPTG 诱导培养 4 h。收集菌体,用 ddH₂O 重悬菌体并加入 SDS 上样缓冲液,将混合液沸水浴 5 min。配制 10% 的 SDS-PAGE 凝胶,将制好的样品进行 SDS-PAGE。

1.3 His-Tag 融合蛋白纯化

用磷酸缓冲盐溶液(PBS)重悬菌体,重悬的菌体置于冰上用超声波破碎,破碎液于 4 °C 12 000 r/min 离心 20 min。取上清到洗涤过的 Ni-NTA 琼脂糖树脂中,冰上孵育 1 h,离心后弃上清。配制含有不同浓度咪唑的 PBS,按照咪唑浓度从低到高的顺序依次洗脱蛋白,收集洗脱样品进行 SDS-PAGE,根据结果选取杂蛋白比较少的洗脱样品测定蛋白浓度,置于-80 °C 保存。

1.4 GST-Tag 融合蛋白纯化

用 PBS 重悬菌体,重悬的菌体置于冰上用超声波破碎,破碎液于 4 °C 12 000 r/min 离心 20 min。取上清到洗涤过的 GST 标签纯化树脂中,冰上孵育 1 h,离心弃上清。用 PBS 多次洗涤树脂,然后用含有 10 mmol/L 还原型谷胱甘肽的 PBS 洗脱蛋白,收集洗脱样品,测定蛋白浓度,置于-80 °C 保存。

1.5 Western blot 印记转移

将制好的蛋白样品进行 SDS-PAGE,根据目标蛋白的大小切除多余的分离胶,依照留下的分离胶大小准备 2 张滤纸和 1 张硝酸纤维素膜(NC 膜)。转膜方法参照 Bio-RAD 公司产品说明书。转膜后用 5% 的脱脂牛奶常温封闭 NC 膜 2 h 或者 4 °C 条件下封闭过夜。用 1% 的脱脂牛奶稀释一抗,将封闭后的 NC 膜与一抗常温孵育 2 h,一抗孵育结束后用 TBS 多次洗涤 NC 膜。用 1% 的脱脂牛奶稀释二抗,将 NC 膜与二抗常温孵育 1 h,二抗孵育结束后用 TBS 多次洗涤 NC 膜。使 NC 膜与化学发光试剂发生反应,通过化学发光成像仪检测信号。

1.6 体外泛素化实验

反应体系中各组分的加入量参考 UBPBIO 公司的技术说明书,在反应管中加入 Buffer、Ub、E1、

E2、ATP 及 ddH₂O 后置于 37 °C 恒温条件下反应 1 h。在反应液中加入非还原性的 SDS 上样缓冲液煮沸 5 min。反应液经 SDS-PAGE 电泳后进行 Western blot。根据泛素蛋白(Ub)分子质量大小判断目标蛋白(E2)是否具有泛素结合酶活性。

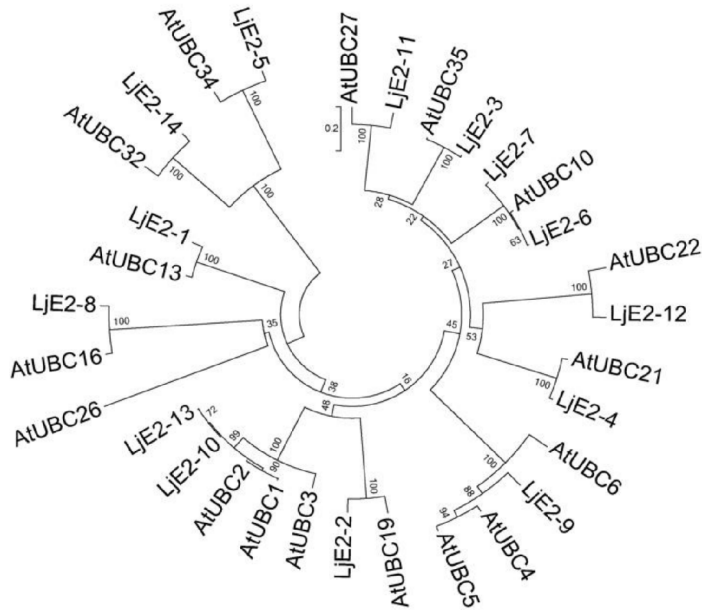
2 结果与分析

2.1 百脉根泛素结合酶 LjE2 的基因分析和克隆构建

在模式植物拟南芥基因组上鉴定出 37 个编码 E2 的基因,根据氨基酸组成和蛋白结构将其分为 12 个亚组^[21]。为了分析百脉根 E2(LjE2),从拟南芥每个亚组至少选取一个 AtE2(共 15 个 AtE2^[22])。利用 Blast 从百脉根中预测出 14 个 LjE2s,进化树分析结果表明,除了 AtUBC26 在百脉根基因组中未比对到同源序列外,其余亚组均找到至少一个同源序列(图 1),将预测的 LjE2s 分为 11 个亚组(表 1)。针对每个基因的序列设计引物,从生长 2 周的百脉根的根组织中提取总 RNA 并反转录得到 cDNA,以 cDNA 为模板扩增全长的 LjE2s,通过酶切酶连的方法将全长的 LjE2s 分别克隆到 pET28a(+),构建融合表达载体 pET-LjE2s:His。经酶切、测序验证后,成功获得 11 个融合表达载体。另外 3 个基因(LjE2-4、LjE2-8、LjE2-12)无论是更换 DNA 聚合酶还是采用温度梯度 PCR 或者巢氏 PCR 均未从 cDNA 中扩增出目的基因,可能是由于百脉根基因组数据库不全所导致的。

2.2 LjE2s 在大肠杆菌中的表达与纯化

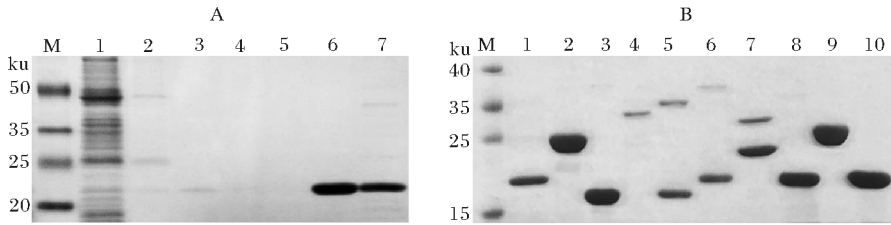
将 11 个融合表达载体分别转化到 *E. coli* DE3 菌株中,表达纯化目标蛋白。以 LjE2-13 蛋白纯化为例,用含有不同浓度咪唑的 PBS 洗脱孵育后的 Ni-NTA 琼脂糖树脂,将洗脱的样品进行 SDS-PAGE,依据考马斯亮蓝染色结果确定漂洗缓冲液中咪唑的浓度为 50 mmol/L,洗脱缓冲液中咪唑的浓度为 250 mmol/L,通过再次纯化即可得到较高浓度的目标蛋白(图 2A)。在此纯化条件下,成功表达纯化出 10 个 LjE2s 蛋白(图 2B),其中 LjE2-6、LjE2-7 和 LjE2-9 的洗脱样品中仍残留有部分杂蛋白,可以考虑适当提高漂洗缓冲液中咪唑的浓度来进一步除去杂蛋白。另外,由于 LjE2-14 蛋白含有 2 个跨膜结构域,跨膜结构域一般含有大量疏水性氨基酸,该蛋白在 *E. coli* 中难以表



系统进化树分析拟南芥和百脉根 E2 的氨基酸序列,系统进化树运用 MEGA 5.1 软件最大似然率算法生成。Full-length amino acid sequences were aligned and maximum likelihood phylogeny estimation was done using the MEGA 5.1 software.

图 1 LjE2s 的系统进化树分析

Fig.1 Phylogenetic tree analysis of LjE2s



A. LjE2-13 融合蛋白表达纯化。M:PageRuler 预染蛋白 marker; 泳道 1-5:50 mmol/L 咪唑洗脱的非特异蛋白; 泳道 6: 250 mmol/L 咪唑洗脱的目标蛋白; 泳道 7:树脂中残留的总蛋白。B.LjE2s 蛋白纯化汇总。M:PageRuler 预染蛋白 marker; 泳道 1-10:纯化后的目标蛋白,依次为:LjE2-1、LjE2-2、LjE2-3、LjE2-5、LjE2-6、LjE2-7、LjE2-9、LjE2-10、LjE2-11、LjE2-13。A. Purification conditions of LjE2-13 protein. M:PageRuler prestained protein marker; Lane 1-5:Nonspecific protein eluted by 50 mmol/L imidazole; Lane 6: The target protein eluted by 250 mmol/L imidazole; Lane 7: The total protein remaining in the resin. B. Summary of LjE2s proteins purification. M:PageRuler prestained protein marker; Lane 1-10 were purified target protein, in turn is LjE2-1, LjE2-2, LjE2-3, LjE2-5, LjE2-6, LjE2-7, LjE2-9, LjE2-10, LjE2-11, LjE2-13.

图 2 LjE2s 融合蛋白表达和纯化

Fig.2 Expression and purification of LjE2s fusion proteins

达和纯化。

2.3 LjE2s 泛素结合酶体外活性鉴定

为了检测泛素结合酶活性和建立百脉根体外泛素化系统,首先将百脉根中的 Ub 克隆到 pGEX-4T1 表达载体上,经表达纯化后得到泛素融合蛋白 GST-Ub。考虑到 GST 可能对泛素化反应存在潜在的影响,利用来源于小麦的 E1(WE1)、来源于人的 E2(UBCH5B)和 GST-Ub 进行体外泛素化。结果显示:在 WE1、UBCH5B 和 GST-Ub 同时存在的样品中,检测到 UBCH5B 结合多聚泛素化链的高分

子条带区段,说明融合蛋白 GST-Ub 可以传递给 E2,而在 70 ku 附近处有一条蛋白带,可能是 GST-Ub(34 ku)形成的二聚体(图 3A)。以 LjE2-7 体外泛素化活性检测为例,在 WE1、His-LjE2-7 和 GST-Ub 同时存在的样品中,可以检测到 His-LjE2-7 结合泛素的高分子条带,说明 LjE2-7 具有泛素结合酶活性(图 3B)。所有表达的蛋白(LjE2s)酶活检测结果表明,除了 LjE2-5 未检测到泛素结合酶活性外(图 3G),其他 9 个 LjE2s 都具有泛素结合酶活性(图 3B-F)。此外,由于未克隆到 LjE2-4、LjE2-8、

LjE2-12 基因, 也未能表达出 LjE2-14 蛋白, 所以不 但进化树分析结果显示, 这 4 个预测的 LjE2s 很可确定这 4 个 LjE2s 是否具有 E2 泛素结合酶活性。能具有泛素结合酶活性(表 1)。

表 1 预测的 LjE2s 的基因信息、蛋白表达、酶活测定

Table 1 Summary of predicted LjE2s genes information, proteins expression, enzymes activity determination

亚组 Sub-group	基因编号 Gene name	登录号 GenBank	蛋白表达 Protein expression	LjE2s 酶活 LjE2s activity
I	LjE2-11	BT145197.1	Yes	+
II	LjE2-10	BT144743.1	Yes	+
	LjE2-13	BT149029.1	Yes	+
III	LjE2-6	BT140765.1	Yes	+
	LjE2-7	BT141360.1	Yes	+
IV	LjE2-5	BT140019.1	Yes	-
	LjE2-14	BT149615.1	No	ND
V	LjE2-1	BT133615.1	Yes	+
VI	LjE2-9	BT143874.1	Yes	+
VII	LjE2-4	BT138011.1	No	ND
VIII	LjE2-2	BT135727.1	Yes	+
IX	LjE2-3	BT136425.1	Yes	+
X	LjE2-8	BT143058.1	No	ND
XI	LjE2-12	BT149106.1	No	ND

注: 参考拟南芥的 E2s 分类将预测的百脉根 E2s 分为 11 个亚组。“Yes”表示成功表达和纯化蛋白, “No”表示没有蛋白, “ND”表示没有进行实验, “+”表示具有酶活, “-”表示不具有酶活。Note: Groups I - XI are based on the classification of *Arabidopsis* E2s. “Yes” indicates good protein expression levels and successful protein purification. “No” indicates no protein. “ND” indicates not done. “+” indicates have enzymes activity. “-” indicates not have enzymes activity.

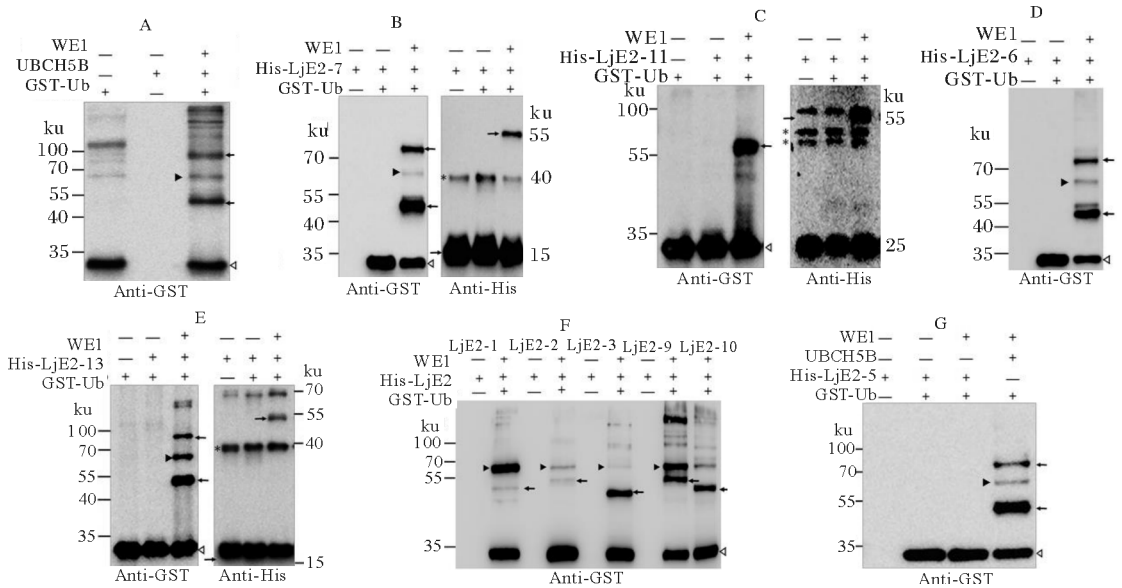


图 3 LjE2s 体外泛素结合酶活性检测

A. 泛素融合 GST 蛋白活性检测。将 WE1、UBCH5B、GST-Ub 置于 37 °C 条件下孵育 1 h。在反应体系中加入 SDS 上样缓冲液终止反应并 100 °C 水浴 5 min, 样品用 12% 的 SDS-PAGE 蛋白凝胶进行电泳。转膜后用 GST 抗体杂交。B-G. 泛素结合酶活性检测。将不同的 LjE2s 与 WE1、GST-Ub 一起孵育, 反应条件同 A, 转膜后用 GST 或者 His 抗体杂交。图中箭头指示 LjE2s 单泛素化或者多泛素化条带, 空三角形指示 GST-Ub, 黑三角形指示的可能是 GST-Ub 的二聚体, 星号指示杂蛋白。A. Detection of GST-Ub activity. GST-Ub was incubated with WE1 and UBCH5B for 1 h at 37 °C. Reaction was terminated by treatment with SDS sample buffer, then 100 °C water bath 5 min, 12% SDS-PAGE protein gel electrophoresis. Western blots were performed using anti-GST antibody. B-E. Detection of partial LjE2s enzyme activity. Different LjE2s were incubated with WE1 and GST-Ub. The reaction conditions are the same as A, Western blots were performed using anti-GST antibody or anti-His antibody. The arrows indicate bands of LjE2s-Ub or LjE2s-Ubs. The open triangles indicate GST-Ub. The black triangles indicate that it may be the dimer of GST-Ub. Asterisks indicate impurity proteins.

Fig.3 Detection of LjE2 subiquitin conjugation enzyme activity in vitro

3 讨 论

豆科植物-根瘤菌间的共生信号通路一直以来被广泛研究并取得了突破性的进展。泛素化作为一种最重要的蛋白质修饰途径在其中也发挥着重要的作用。百脉根中的 E3 泛素连接酶 SIE3 和 SIN4 以及蒺藜苜蓿中的 E3 泛素连接酶 PUB1 和 PUB2 均被研究发现参与调控共生信号通路^[18-20]。相较于庞大的 E3 家族,目前在豆科植物中发现的 E3 只是很小的一部分,还有更多潜在的 E3 没有被发现。一方面是因为相较于其他修饰途径如磷酸化而言,泛素化反应的机制更加复杂而难以研究;另一方面也是由于长期以来对于泛素化的研究只关注 E3 和底物间的特异性,往往忽略了 E2 在泛素化反应中的关键作用。通过酵母双杂交筛选和同源建模的方法,人体内已经有超过 300 对的 E2/E3 组合被发现并在体外泛素化实验中被部分证实^[23-24]。这表明在决定底物特异性和泛素修饰类型的过程中,E2 也发挥着重要的作用,所以对于泛素化的研究不再适合仅侧重研究 E3。考虑到泛素化系统中 E2 和 E3 间的特异性^[13],许多潜在的 E3 并不能用传统外源的 E1 或者特异性外源的 E2 检测到其活性。因此,在百脉根中建立自身体外泛素化系统对研究豆科植物中的 E3 具有十分重要的意义。

本研究利用拟南芥的部分 E2 通过同源序列比对寻找百脉根中潜在的 E2,通过体外泛素化实验发现了 9 个有活性的 E2,为百脉根体外泛素化系统的建立提供了部分实验材料。但是参考拟南芥和人体内 E2 的数量^[9,25],同时考虑到泛素化底物的特异性和多样性,百脉根中还有更多潜在的 E2 没有被发现。后续可以利用其他物种特别是豆科植物中已知的 E2 检索百脉根中潜在的 E2。此外,虽然 E1 在不同物种中具有高度的保守性,但是克隆百脉根自身的 E1 对增加体外泛素化系统的可靠性和稳定性仍具有十分重要的意义。笔者所在研究室前期工作中发现在百脉根中预测的与共生固氮相关的部分 E3 在体外难以检测到其泛素连接酶活性,很可能是由于 E2 和 E3 不能特异性识别造成的。利用本研究结果构建百脉根特异性体外泛素化系统可以提高体外检测 E3 酶活的准确性,为后续研究泛素化在共生固氮中的作用奠定基础。

参 考 文 献

- [1] SCHWARTZ D C, HOCHSTRASSER M. A superfamily of protein tags: ubiquitin, SUMO and related modifiers [J]. Trends in biochemical sciences, 2003, 28(6): 321-328.
- [2] 陈霞, 罗良煌. 蛋白质翻译后修饰简介 [J]. 生物学教学, 2017, 42(2): 70-72.
- [3] MORENO S P, GAMBUS A. Regulation of unperturbed DNA replication by ubiquitylation [J]. Genes, 2015, 6(3): 451-468.
- [4] HERRMANN J, LERMAN L O, LERMAN A. Ubiquitin and ubiquitin-like proteins in protein regulation [J]. Circulation research, 2007, 100(9): 1276-1291.
- [5] SHAID S, BRANDTS C H, SERVE H, et al. Ubiquitination and selective autophagy [J]. Cell death and differentiation, 2013, 20(1): 21-30.
- [6] ULRICH H D, WALDEN H. Ubiquitin signalling in DNA replication and repair [J]. Nature reviews molecular cell biology, 2010, 11(7): 479-489.
- [7] 王金利, 史胜青, 贾利强, 等. 植物泛素结合酶 E2 功能研究进展 [J]. 生物技术通报, 2010(4): 7-10.
- [8] HERSHKO A, CIECHANOVER A. The ubiquitin system [J]. Annual review of biochemistry, 1998, 67: 425-479.
- [9] VIERSTRA R D. The ubiquitin-26S proteasome system at the nexus of plant biology [J]. Nature reviews molecular cell biology, 2009, 10(6): 385-397.
- [10] SADOWSKI M, SURYADINATA R, LAI X, et al. Molecular basis for lysine specificity in the yeast ubiquitin-conjugating enzyme Cdc34 [J]. Molecular & cellular biology, 2010, 30(10): 2316-2329.
- [11] WU T, MERBL Y, HUO Y, et al. UBE2S drives elongation of K11-linked ubiquitin chains by the anaphase-promoting complex [J]. PNAS, 2010, 107(4): 1355-1360.
- [12] YE Y, RAPE M. Building ubiquitin chains: E2 enzymes at work [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2009, 10(11): 755-764.
- [13] CHRISTENSEN D E, KLEVIT R E. Dynamic interactions of proteins in complex networks: identifying the complete set of interacting E2s for functional investigation of E3-dependent protein ubiquitination [J]. Febs Journal, 2009, 276(19): 5381-5389.
- [14] 杨倩倩, 刘元, 陈大松, 等. 蒺藜苜蓿中 1 个聚半乳糖醛酸酶基因突变体的筛选及共生固氮表型的初步鉴定 [J]. 华中农业大学学报, 2017, 36(4): 62-70.
- [15] 李文清, 曹文刚, 李豪, 等. 百脉根 4 个共生基因在水稻中的共表达及其对水稻转录组的影响 [J]. 华中农业大学学报, 2017, 36(4): 55-61.
- [16] 汪涛, 冯勇, 张忠明. 百脉根 *LjSERKs* 基因家族在根瘤共生中的功能鉴定 [J]. 华中农业大学学报, 2018, 37(2): 9-15.
- [17] RYU H, CHO H, CHOI D, et al. Plant hormonal regulation of nitrogen-fixing nodule organogenesis [J]. Molecules & cells,

- 2012,34(2):117-126.
- [18] YUAN S,ZHU H,GOU H,et al. A Ubiquitin ligase of symbiosis receptor kinase involved in nodule organogenesis[J]. *Plant physiology*,2012,160(1):106-117.
- [19] DEN H G,YOSHIDA S,ANTOL N LLOVERA M,et al. *Lotus japonicus* E3 ligase seven in absentia4 destabilizes the symbiosis receptor-like kinase SYMRK and negatively regulates rhizobial infection[J]. *Plant cell*,2012,24(4):1691-1707.
- [20] VERNI T,CAMUT S,CAMPS C,et al. PUB1 interacts with the receptor kinase DMI2 and negatively regulates rhizobial and arbuscular mycorrhizal symbioses through its ubiquitination activity in *Medicago truncatula* [J]. *Plant physiology*,2016,170(4):1694-2015.
- [21] BACHMAIR A,NOVATCHKOVA M,POTUSCHAK T,et al. Ubiquitylation in plants: a post-genomic look at a post-translational modification[J]. *Trends in plant science*,2001,6(10):463-470.
- [22] ZHAO Q,TIAN M,LI Q,et al. A plant-specific *in vitro* ubiquitination analysis system[J]. *Plant journal for cell & molecular biology*,2013,74(3):524-533.
- [23] MARKSON G,KIEL C,HYDE R,et al. Analysis of the human E2 ubiquitin conjugating enzyme protein interaction network [J]. *Genome research*,2009,19(10):1905-1911.
- [24] WIJK S J L V,VRIES S J D,KEMMEREN P,et al. A comprehensive framework of E2-RING E3 interactions of the human ubiquitin-proteasome system [J]. *Molecular systems biology*,2009,5(1):295.doi:10.1038/msb.2009.55.
- [25] DESHAIES R J,JOAZEIRO C A P,RING Domain E3 ubiquitin ligases[J]. *Annual review of biochemistry*,2009,78(1):399-434.

Expression and activity identification of ubiquitin-binding enzyme LjE2 of *Lotus japonicus*

LIU Chao FENG Yong DONG Xiaoxiao ZHANG Zhongming ZHU Hui

State Key Laboratory of Agricultural Microbiology/College of Life Science and Technology,
Huazhong Agricultural University,Wuhan 430070,China

Abstract Fourteen genes encoding E2(LjE2) in *Lotus japonicus* genome were identified based on the sequence of E2 in *Arabidopsis* to study the function and mechanism of ubiquitination in the process of symbiotic nitrogen fixation in legumes. Among them,eleven LjE2s were cloned to construct the fusion expression vectors pET-LjE2s;His. Ten LjE2 proteins were successfully expressed and purified under the prokaryotic expression system. The results of ubiquitination *in vitro* and Western blotting showed that nine LjE2s had ubiquitin-conjugation enzyme activity and one had no detectable ubiquitin-conjugation enzyme activity.

Keywords *Lotus japonicus*; ubiquitin-conjugating enzyme; *in vitro* ubiquitination; prokaryotic expression systems

(责任编辑:张志钰)