

β-葡萄糖苷酸酶 (β-glucuronidase, β-GUS) 试剂盒说明书

(分光法 48 样)

一、产品简介：

β-葡萄糖苷酸酶 (β-GUS, EC 3.2.1.31) 是一种分布广泛的水解酶。在动物和微生物中都有分布；但在绝大多数植物细胞和许多细菌及真菌内不存在内源 GUS 活性，因而 GUS 基因广泛用作转基因植物、细菌和真菌的报告基因。

β-葡萄糖苷酸酶 (β-GUS) 水解对硝基酚-D-葡萄糖醛酸苷生成对硝基酚 (PNP)，通过检测该产物在 405nm 处的增加速率即可得出 β-GUS 酶活性大小。

二、试剂盒的组成和配制：

| 试剂名称 | 规格 | 保存要求 | 备注 |
|------|-------------|---------|---|
| 提取液 | 液体 60mL×1 瓶 | 4℃ 保存 | |
| 试剂一 | 液体 35mL×1 瓶 | 4℃ 保存 | |
| 试剂二 | 粉剂 mg×1 支 | -20℃ 保存 | 临用前甩几下或离心使粉剂落入底部，再加 4.2mL 蒸馏水溶解备用，-20℃ 保存 |
| 试剂三 | 液体 40mL×1 瓶 | 4℃ 保存 | |
| 标准品 | 粉体 mg×1 支 | 4℃ 保存 | 若重新做标曲，则用到该试剂 |

三、所需的仪器和用品：

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm)、台式离心机、水浴锅、可调式移液器、研钵、冰。

四、β-葡萄糖苷酸酶 (β-GUS) 活性测定：

1、样本制备：

① 组织样本：取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液，进行冰浴匀浆。15000rpm，4℃ 离心 10min，取上清，置冰上待测。

【注】：若增加样本量，可按照组织质量 (g)：提取液体积 (mL) 为 1：5~10 的比例进行提取

② 细菌或细胞：先收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；取约 500 万细菌或细胞，加入 1mL 提取液，超声波破碎细菌或细胞 (冰浴，功率 20% 或 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次)；15000 rpm 4℃ 离心 10min，取上清，置冰上待测。

【注】：若增加样本量，可按照细菌或细胞数量 (10^4 个)：提取液体积 (mL) 为 500~1000：1 的比例进行提取。

2、上机检测：

① 可见分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 405nm，蒸馏水调零。

② 所有试剂解冻至室温，在 EP 管中依次加入：

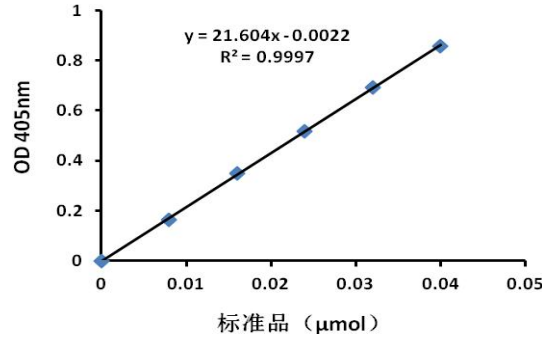
| 试剂名称 (μL) | 测定管 | 对照管 |
|--|-----|-----|
| 样本 | 40 | 40 |
| 试剂一 | 280 | 360 |
| 试剂二 | 80 | |
| 迅速混匀，37℃ 保温 30min | | |
| 试剂三 | 400 | 400 |
| 混匀，若有沉淀需室温 12000rpm 离心 5min 后，取全部澄清液体至 1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm) 中，于 405nm 处测定吸光值 A， $\Delta A = A_{测定} - A_{对照}$ (每个测定管需设一个对照管)。 | | |

【注】1.若 ΔA 较小,可以增加 37°C保温反应时间 T (如增至 1 小时),或增加样本量 V1 (如增至 80 μ L, 则试剂一相应减少), 则改变后的 T 和 V1 需重新代入计算公式计算。

2. ΔA 最好控制在标准曲线的线性范围内, 若 ΔA 的值超过 1, 可对样本进行稀释再测定, 稀释倍数 D 代入计算公式计算; 或减少样本量 V1 (如减至 20 μ L, 则试剂一相应增加), 或减少 37°C保温反应时间 T (如减至 10min), 则改变后的 T 和 V1 需重新代入计算公式计算。

五、结果计算:

1、标准曲线: $y = 21.604x - 0.0022$, x 是标准品 (PNP) 摩尔质量 (μ mol); y 是 ΔA 。



2、按照样本质量计算:

酶活定义: 在 37°C 下, 每克组织每小时水解 1 μ mol 底物产生 PNP 定义为 1 个酶活单位。

$$\beta\text{-GUS 活性}(\mu\text{mol/h/g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0022) \div 21.604] \div (W \times V1 \div V) \div T \times D$$

$$= 2.32 \times (\Delta A + 0.0022) \div W \times D$$

3、按照样本蛋白浓度计算:

酶活定义: 在 37°C 下, 每毫克蛋白每小时水解 1 μ mol 底物产生 PNP 定义为 1 个酶活单位。

$$\beta\text{-GUS } (\mu\text{mol/h/mg prot}) = [(\Delta A + 0.0022) \div 21.604] \div (Cpr \times V1) \div T \times D = 2.32 \times (\Delta A + 0.0022) \div Cpr \times D$$

4、按细胞数量计算:

酶活定义: 在 37°C 下, 每 10⁴ 个细胞每小时水解 1 μ mol 底物产生 PNP 定义为 1 酶活单位。

$$\beta\text{-GUS } (\mu\text{mol/h}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.0022) \div 21.604] \div (500 \times V1) \div T \times D = 0.005 \times (\Delta A + 0.0022) \times D$$

5、按液体体积计算:

酶活定义: 在 37°C 下, 每毫升液体每小时水解 1 μ mol 底物产生 PNP 定义为 1 个酶活单位。

$$\beta\text{-GUS } (\mu\text{mol/h/mL}) = [(\Delta A + 0.0022) \div 21.604] \div V1 \div T \times D = 2.32 \times (\Delta A + 0.0022)$$

W---样品质量, g;

V---提取液体积, 1 mL;

V1---上清液体积 (mL), 0.04mL;

T---反应时间, 30 min=1/2h;

D---稀释倍数, 未稀释即为 1;

Cpr---上清液蛋白质浓度, mg/mL; 建议使用本公司的 BCA 蛋白质含量测定试剂盒。

附: 标准曲线制作过程:

- 1 制备标准品母液 (10 μ mol/mL): 向标准品 EP 管里面加入 1mL 蒸馏水溶解, 若有结晶析出, 需 37°C 水浴至完全溶解。
- 2 把母液稀释成以下浓度梯度的标准品: 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1 μ mol/mL。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 依据 40 μ L 的标准品+360 μ L 的试剂二, 再加 400 μ L 的试剂三, 于 405nm 处读值; 根据结果即可制作标准曲线。