

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

(微板法 96 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 100mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	液体 35mL×1 瓶	4°C保存	
试剂二	粉剂 mg×1 支	-20°C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°C保存
试剂三	液体 40mL×1 瓶	4°C保存	
标准品	粉体 mg×1 支	4°C保存	若重新做标曲, 则用到该试剂

三、所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、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°C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°C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 (10⁴个): 提取液体积 (mL) 为 500~1000: 1 的比例进行提取。

2、上机检测:

① 酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 405nm。

② 所有试剂解冻至室温, 在 EP 管中依次加入:

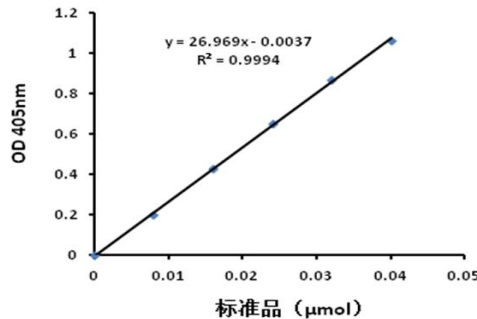
试剂名称 (μL)	测定管	对照管
样本	20	20
试剂一	140	180
试剂二	40	
迅速混匀, 37°C保温 30min		
试剂三	200	200
混匀, 若有沉淀需室温 12000rpm 离心 5min 后, 取 200μL 上清液至 96 孔板中, 于 405nm 处测定吸光值 A, ΔA=A 测定-A 对照 (每个测定管需设一个对照管)。		

【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 40μL, 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 V_1 (如减至 $10\mu\text{L}$, 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 V_1 需重新代入计算公式计算。

五、结果计算:

- 1、标准曲线: $y=26.969x - 0.0037$, x 是标准品 (PNP) 摩尔质量 (μmol); 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 $1\mu\text{mol}$ 底物产生 PNP 定义为 1 个酶活单位。

$$\beta\text{-GUS 活性}(\mu\text{mol/h/g 鲜重})=[(\Delta A+0.0037)\div 26.969]\div(W\times V_1\div V)\div T\times D$$

$$=3.71\times(\Delta A+0.0037)\div W\times D$$

- 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 $1\mu\text{mol}$ 底物产生 PNP 定义为 1 个酶活单位。

$$\beta\text{-GUS}(\mu\text{mol/h/mg prot})=[(\Delta A+0.0037)\div 26.969]\div(Cpr\times V_1)\div T\times D$$

$$=3.71\times(\Delta A+0.0037)\div Cpr\times D$$

- 4、按细胞数量计算:

酶活定义: 在 37°C 下, 每 10^4 个细胞每小时水解 $1\mu\text{mol}$ 底物产生 PNP 定义为 1 酶活单位。

$$\beta\text{-GUS}(\mu\text{mol/h}/10^4\text{ cell})=[(\Delta A+0.0037)\div 26.969]\div(500\times V_1)\div T\times D=0.0074\times(\Delta A+0.0037)\times D$$

- 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 $1\mu\text{mol}$ 底物产生 PNP 定义为 1 个酶活单位。

$$\beta\text{-GUS}(\mu\text{mol/h/mL})=[(\Delta A+0.0037)\div 26.969]\div V_1\div T\times D=3.71\times(\Delta A+0.0037)$$

W---样品质量, g;

V---提取液体积, 1 mL;

V_1 ---上清液体积 (mL), 0.02mL;

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 ($10\mu\text{mol/mL}$): 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, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6, $2\mu\text{mol/mL}$ 。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 依据 $20\mu\text{L}$ 的标准品+ $180\mu\text{L}$ 的试剂二, 再加 $200\mu\text{L}$ 的试剂三, 于 405nm 处读值; 根据结果即可制作标准曲线。