

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

(货号: G0579W 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 (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:

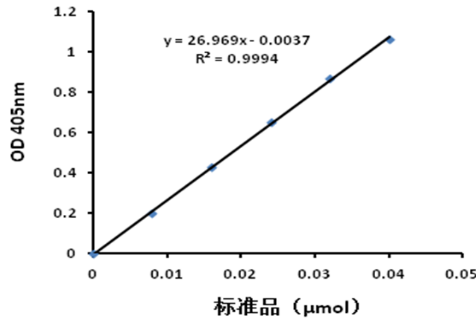
① 酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 405nm。

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, $\Delta A = A$ 测定 - A 对照 (每个测定管需设一个对照管)。		

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。

$$\beta\text{-GUS 活性}(\mu\text{mol/h/g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0037) \div 26.969] \div (W \times V1 \div V) \div T \times D$$

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

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。

$$\beta\text{-GUS }(\mu\text{mol/h/mg prot}) = [(\Delta A + 0.0037) \div 26.969] \div (Cpr \times V1) \div T \times D$$

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

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。

$$\beta\text{-GUS }(\mu\text{mol/h}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.0037) \div 26.969] \div (500 \times V1) \div T \times D = 0.0074 \times (\Delta A + 0.0037) \times D$$

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。

$$\beta\text{-GUS }(\mu\text{mol/h/mL}) = [(\Delta A + 0.0037) \div 26.969] \div V1 \div T \times D = 3.71 \times (\Delta A + 0.0037)$$

W---样品质量，g；

V---提取液体积，1 mL；

V1---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+ $180\mu\text{L}$ 的试剂一，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。