

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

(货号: GY05104W 荧光法 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。

该法以 4-甲基伞形酮酰-β-D-葡萄糖醛酸苷酯(4-MUG)为底物, GUS 催化其水解生成 4-甲基伞形酮(4-MU)及β-D 葡萄糖醛酸。4-MU 分子中的羟基解离后被 365nm 的光激发,产生 455nm 的荧光,通过荧光量来计算 GUS 酶活力。

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 110mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂一	液体 12mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂二	粉剂 mg×2 支	-20°C 保存	临用前甩几下或离心使粉剂落入底部,每支再加 3mL 蒸馏水溶解(可超声溶解),溶解好的试剂-20°C 保存。
试剂三	液体 11mL×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、黑色 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。12000rpm, 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 比例进行提取。

2、上机检测:

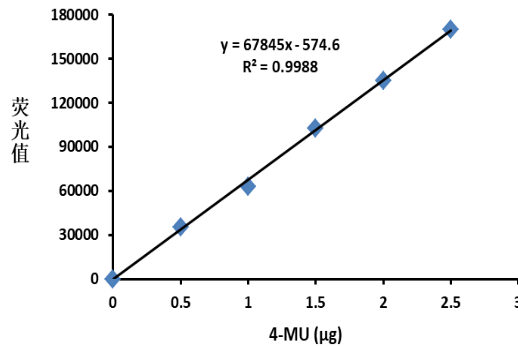
① 酶标仪预热 30min 以上,调节波长。

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	空白管
样本	50	
提取液		50
试剂一	100	100
试剂二	50	50
迅速混匀, 37°C 保温 30min		
试剂三	100	100
混匀,若有沉淀需室温 12000rpm 离心 5min 后,取 200μL 上清液至黑色 96 孔板中,于激发波长 365nm,发射波长 455nm 处测定吸光值 A, $\Delta A = A_{测定} - A_{空白}$ 。		

五、结果计算：

1、标准曲线方程为 $y = 67845x - 574.6$ ；x 为标准品即 4-MU 的质量 (μg)，y 为 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 1nmol 底物产生 4-MU 定义为 1 个酶活单位。

$$\beta\text{-GUS 活性}(\text{nmol/h/g 鲜重}) = [(\Delta A + 574.6) \div 67845] \div 176.2 \times 10^3 \div (W \times V_1 \div V) \div T \times D$$

$$= 0.0034 \times (\Delta A + 574.6) \div W \times D$$

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 1nmol 底物产生 4-MU 定义为 1 个酶活单位。

$$\beta\text{-GUS}(\text{nmol/h/mg prot}) = [(\Delta A + 574.6) \div 67845] \div 176.2 \times 10^3 \div (C_{\text{pr}} \times V_1) \div T \times D$$

$$= 0.0034 \times (\Delta A + 574.6) \div C_{\text{pr}} \times D$$

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 1nmol 底物产生 4-MU 定义为 1 个酶活单位。

$$\beta\text{-GUS}(\text{nmol/h}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A + 574.6) \div 67845] \div 176.2 \times 10^3 \div (500 \times V_1 \div V) \div T \times D$$

$$= 0.0034 \times (\Delta A + 574.6) \div 500 \times D$$

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 1nmol 底物产生 4-MU 定义为 1 个酶活单位。

$$\beta\text{-GUS}(\text{nmol/h/mL}) = [(\Delta A + 574.6) \div 67845] \div 176.2 \times 10^3 \div V_1 \div T \times D$$

$$= 0.0034 \times (\Delta A + 574.6) \times D$$

W---样品质量，g；

V---提取液体积，1 mL；

V₁---上清液体积 (mL)，0.05mL；

T---反应时间，30 min=1/2h；

D---稀释倍数，未稀释即为 1；

500---细胞数量，万； 176.2---4-MU 的分子量；

C_{pr}---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 (0.1mg/mL)：向标准品管中加入 2mL 乙醇溶解即 1mg/mL ，再用乙醇稀释 10 倍即得 0.1mg/mL 标准品母液。
- 2 把母液用乙醇稀释成以下浓度梯度的标准品：0, 10, 20, 30, 40, $50\mu\text{g/mL}$ 。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 依据测定管加样体系，于激发波长 365nm ，发射波长 455nm 处测定；根据结果即可制作标准曲线。