

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

(货号: G05104W48 荧光法 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。

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 55mL×1 瓶	4°C保存	
试剂一	液体 6mL×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 1.5mL 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 6mL×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:

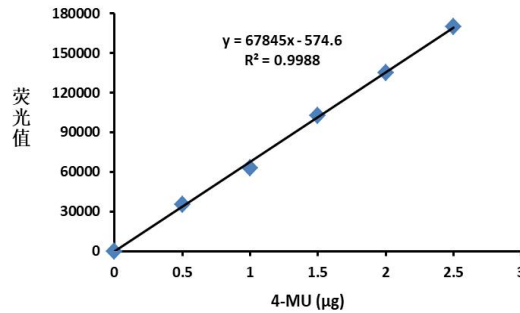
试剂名称 (μL)	测定管	空白管
样本	50	
提取液		50
试剂一	100	100
试剂二	50	50
迅速混匀, 37°C保温 30min		
试剂三	100	100
混匀,若有沉淀需室温 12000rpm 离心 5min 后,取 200μL 上清液至黑色 96 孔板中,于激发波长 365nm,发射波长 455nm 处测定吸光值 A, ΔA=A 测定-A 空白。		

【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,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 的值超过标准曲线最高点,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 10 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、标准曲线方程为 $y = 67845x - 574.6$; x 为标准品即 4-MU 的质量 (μ g), 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。

$$\beta\text{-GUS 活性(nmol/h/g 鲜重)} = [(\Delta A + 574.6) \div 67845] \div 176.2 \times 10^3 \div (W \times V1 \div V) \div T \times D$$

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

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。

$$\beta\text{-GUS (nmol/h/mg prot)} = [(\Delta A + 574.6) \div 67845] \div 176.2 \times 10^3 \div (Cpr \times V1) \div T \times D$$

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

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 1nmol 底物产生 4-MU 定义为 1 酶活单位。

$$\beta\text{-GUS (nmol/h/10}^4 \text{ cell)} = [(\Delta A + 574.6) \div 67845] \div 176.2 \times 10^3 \div (500 \times V1 \div V) \div T \times D$$

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

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。

$$\beta\text{-GUS (nmol/h/mL)} = [(\Delta A + 574.6) \div 67845] \div 176.2 \times 10^3 \div V1 \div T \times D$$

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

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;

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 (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 μ 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。