

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

(货号: BP10292W 微板法 96 样 有效期: 6 个月)

一、指标介绍:

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:

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
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 1 瓶	-20°C保存	1. 开盖前注意使粉剂落入底部(可手动甩一甩); 2. 加入 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 1 支	4°C避光保存	1. 若重新做标曲, 则用到该试剂; 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制; 3. 溶解后的标品一周内用完。

三、实验器材:

研钵(匀浆机)、冰盒(制冰机)、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅(烘箱、培养箱、金属浴)、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水(去离子水、超纯水均可)。

四、指标测定:

1、样本提取:

- 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、检测步骤:

- 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:

试剂组分 (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

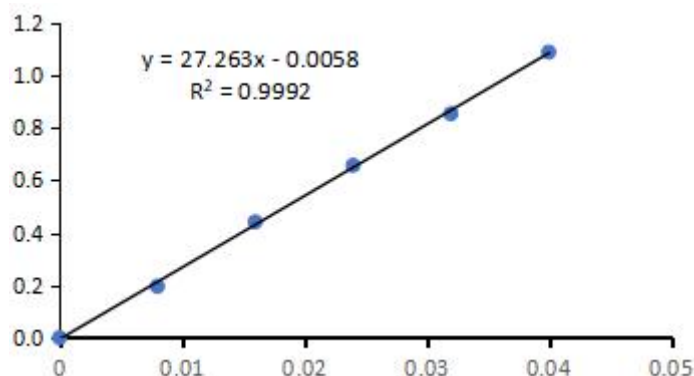
混匀，若有沉淀需室温 12000rpm 离心 5min 后，取 200μL 上清液至 96 孔板中，于 405nm 处测定吸光值 A， $\Delta A = A$ 测定 -A 对照（每个测定管需设一个对照管）。

【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 V1（如减至 10μL，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： $y = 27.263x - 0.0058$ ，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 1μmol 底物产生 PNP 定义为 1 个酶活单位。

$$\beta\text{-GUS 活性}(\mu\text{mol/h/g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0058) \div 27.263] \div (W \times V1 \div V) \div T \times D$$

$$= 3.67 \times (\Delta A + 0.0058) \div W \times D$$

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 1μmol 底物产生 PNP 定义为 1 个酶活单位。

$$\beta\text{-GUS}(\mu\text{mol/h/mg prot}) = [(\Delta A + 0.0058) \div 27.263] \div (Cpr \times V1) \div T \times D$$

$$= 3.67 \times (\Delta A + 0.0058) \div Cpr \times D$$

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 1μmol 底物产生 PNP 定义为 1 酶活单位。

$$\beta\text{-GUS}(\mu\text{mol/h}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.0058) \div 27.263] \div (500 \times V1) \div T \times D = 0.0073 \times (\Delta A + 0.0058) \times D$$

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 1μmol 底物产生 PNP 定义为 1 个酶活单位。

$$\beta\text{-GUS}(\mu\text{mol/h/mL}) = [(\Delta A + 0.0058) \div 27.263] \div V1 \div T \times D = 3.67 \times (\Delta A + 0.0058)$$

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 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，标准品母液浓度为 10μmol/mL。将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0, 0.4, 0.8, 1.2, 1.6,

2 μ mol/mL。也可根据实际样本调整标准品浓度。

2 标品稀释参照表如下：

吸取标准品母液 200 μ L，加入 800 μ L 蒸馏水，混匀得到 2 μ mol/mL 的标品稀释液待用。						
标品浓度 μ mol/mL	0	0.4	0.8	1.2	1.6	2
标品稀释液 μ L	0	40	80	120	160	200
水 μ L	200	160	120	80	40	0
各标准管混匀待用。						

3 依据加样表操作，根据结果，以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值，过 0 点制作标准曲线。

试剂名称 (μ L)	标准管	0 浓度管 (仅做一次)
标品	20	
蒸馏水		20
试剂一	180	180
试剂三	200	200
混匀，取 200 μ L 上清液至 96 孔板中于 405nm 处读取吸光值 A， $\Delta A = A$ 测定-0 浓度管。		