

β -glucuronidase Activity Kit

β -葡萄糖苷酸酶 (β -GUS) 试剂盒说明书

货号:BN72126 | 方法: 微板法 | 规格: 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℃保存	
试剂一	液体 35mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	粉剂 mg×1 支	-20℃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℃保存
试剂三	液体 40mL×1 瓶	4℃保存	
标准品	粉体 mg×1 支	4℃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℃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℃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:

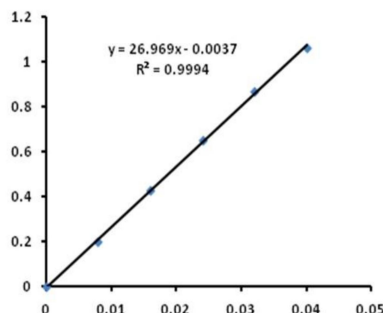
试剂名称 (μ L)	测定管	对照管
样本	20	20
试剂一	140	180
试剂二	40	
迅速混匀, 37℃保温 30min		
试剂三	200	200
混匀, 若有沉淀需室温 12000rpm 离心 5min 后, 取 200 μ L 上清液至 96 孔板中, 于 405nm 处测定吸光值 A,		

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

注意：本操作流程适用于绝大多数常规样本检测，实验条件可根据实际样本状态适度微调；
针对特殊类型样本，我司技术支持可提供专属优化建议。

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 。



标准曲线示意图

说明：标准曲线由标准品测定获得，具体制作方法详见随货说明书或咨询技术支持。

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。