

## X-Gluc 5-溴-4-氯-3-吲哚-β-D-葡萄糖苷酸环己胺盐

### 产品信息:

**产品名称:** X-Gluc 5-溴-4-氯-3-吲哚-β-D-葡萄糖苷酸环己胺盐

### 规格:

目录号	产品名称	规格
X11461	X-Gluc 5-溴-4-氯-3-吲哚-β-D-葡萄糖苷酸环己胺盐	100mg
X11462	X-Gluc 5-溴-4-氯-3-吲哚-β-D-葡萄糖苷酸环己胺盐	1g

### 产品说明:

CAS 号	114162-64-0
分子式	C <sub>14</sub> H <sub>13</sub> BrClNO <sub>7</sub> .C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> N
分子量	521.79g/mol
纯度	> 99%(By HPLC)
外观	白色至类白色结晶粉末
溶解性	DMF 和甲醇
运输	冰袋运输
保存	-20°C保存, 5 年有效

### 作用机制:

X-Gluc, 也称为 5- Bromo-4-chloro-3-indoxyl-beta-D-glucuronide (5-溴-4-氯-3-吲哚-β-D-葡萄糖苷酸), 是β-葡萄糖苷酶 (β-glucuronidase, GUS)的显色底物, 由一种广泛使用的报告基因 *gusA* (*uidA*) 所编码。GUS 水解 X-Gluc, 生成一种无色的葡萄糖醛酸和一种肉眼可见的氯-溴靛蓝(chloro-bromoindigo)深蓝色沉淀。利用这一特性, X-Gluc 常 用来检测植物细胞和组织中的 GUS 表达;另外, X-Gluc 还能用来检测大肠杆菌引起的感染状况;或检测食物或水源是否受细菌污染。

**主要应用:** 转基因植物报告基因 GUS 活性检测, X-gluc 用作显色底物。

普遍应用优势在于: 绝大多数植物细胞内不存在内源性的 GUS 活性,而且 GUS 基因表达产物具有检测方法简单、灵敏度高, 易于定量及定性分析, 能够与其他蛋白质基因融合等优势, 因此, GUS 基因为植物工程研究中应用最广泛的报告基因(报道基因)之一。

#### 1. GUS 活性检测(组织化学定位法,定性研究)

GUS 催化底物 X-gluc 在酶活性位点生成深蓝色沉淀, 为研究外源基因在植物中表达具体部位研究提供很好的研究手段。且 GUS 酶和显色产物非常稳定, 植物中可以积累。

##### 1.1 GUS 染色液制备[作为参考, 可按照具体实验条件来调整]

试剂名称	配置方法	用量	备注说明
X-Gluc 储存液	溶解 1mg X-gluc 于 0.1ml 甲醇, 低速旋涡充分溶解	100ul	最早实验使用 DMF 作为 X-gluc 溶剂, 但是有研究发现 DMF 会抑制 GUS 活性, 使用甲醇作为溶剂可将 GUS 活性提高 25%
2 x buffer	磷酸盐缓冲液 PH7.0(0.1 M NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /0.1 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ); 柠檬酸-盐酸溶液 PH7.0 (0.1 M sodium citrate/0.2 M HCL)	1ml	体外 X-gluc 活性(荧光定量染色)显示, 使用柠檬酸盐酸溶液可将 GUS 活性提高 20%。
0.1 M potassium ferrocyanide	将 4.2239g 亚铁氰化钾溶于水, 定容至 100ml	20ul	亚铁-/铁氰化钾的最佳工作浓度需要摸索, 建议最好起始工作浓度为 1 mM.
0.1 M potassium ferricyanide	将 3.2924g 铁氰化钾溶于水, 定容至 100ml.	20ul	
10% Triton X-100		10ul	
H <sub>2</sub> O		850ul	

## 1.2 GUS 定性染色步骤

- 于预冷固定液(4%多聚甲醛溶液, 新鲜制备)固定样本 30min,偶尔摇晃或置于低速摇床上固定;
  - 使用预冷的 1 x 磷酸盐或柠檬酸盐酸溶液清洗固定样本 30-60min,中间更换几次清洗液;
  - 真空渗透法将 X-Gluc 染色液加入待染色样本 [对于组织培养的拟南芥不需用真空渗透; ]黑暗条件室温或者 37°C 孵育几小时或过夜,或者明显的蓝色沉淀出现(不超过 24h) ;
  - 去离子清洗染色样本;
  - 对于绿色样本, 使用 70%乙醇脱色直到叶绿体完全去除, 然后转移到去离子水内清洗;对于种子或其他样本, 参考文献 An Improved Clearing Method for GUS Assay in Arabidopsis Endosperm and Seeds 的替代方法;
  - 肉眼或显微镜下观察, 白色背景上的蓝色小点即为 GUS 表达位点。
- [备注]:可直接订购我司(MKbio) 提供的 GUS 染色试剂盒(组织化学法), 经济实惠, 使用方便,节省溶液配制的大量麻烦步骤。

## 2. GUS 活性检测(荧光分析法,定量研究)

GUS 催化荧光底物 MUG 4-甲基伞型酮-beta-D-葡萄糖苷酸,将其水解为 4-MU (4-甲基伞型酮)和β-D-葡萄糖醛酸。4-MU 中的羟基解离后在 365nm 的光激发下产生 455nm 的荧光。此时用荧光分光光度计测定得到的是相对值,因此同时需要用标准物 4-MU 进行校准。

荧光定量分析 GUS 活性有两种基本方法: 1) 在一个时间点测定 GUS 酶作用产物的总荧光量, 需要设定空白对照, 以消除内源荧光强度; 2)测定一段时间内 GUS 的动力学过程。在酶反应初始阶段, 酶作用产物与时间呈线性关系, 而内源性荧光物质的荧光量与时间无线性关系。由此可计算 GUS 酶活力。GUS 酶活性通常以μg MU/min/mg 蛋白质。有时也可以用样本的鲜重来表示。

### 2.1 检测步骤[仅作参考, 根据具体实验条件做适当调整]

a)取约 100mg 愈伤组织或一片新鲜叶盘于 1.5ml 离心管内,加入 100 $\mu$ l 萃取缓冲液(extraction buffer)内匀浆。可加入少量沙子或玻璃珠提高研磨效率。

萃取缓冲液(extraction buffer) 配方: 50mM 磷酸盐缓冲液(pH 7.0), 10mM DTT, 1mM Na<sub>2</sub>EDTA, 0.1% 十二烷基肌氨酸, 0.1% Triton X-100

b) 4°C, 15,000rpm 离心 5min.收集上清转移到另一干净的 1.5ml 离心管, 冰上放置待用。

c)取 50 $\mu$ l 上述萃取上清到 0.5ml 37°C 预热的反应缓冲液(Assay buffer) ;用移液枪吹匀或漩涡混匀。  
反应缓冲液(Assay Buffer) :称取 17.6mg MUG 溶于 50ml 萃取缓冲液,此时即为 1mM MUG 反应液。4°C 保存, 2 周稳定。

d)在某一时间段内(高 GUS 活性样本 30min;或低 GUS 活性 1h-过夜;)吸取 100 $\mu$ l 溶液到含 900 $\mu$ l 终止液(Stop Buffer)的 1.5ml 离心管内, 做好标记。有可能采集 3-4 个时间点和过夜孵育的时间点荧光量。[用荧光分光光度计在激发波长 365nm、 发射波长 455nm 下, 狭缝 10nm 时测定不同时间点的荧光强度值。]

e)以荧光强度值对反应时间作曲线, 求出单位时间的荧光强度变化。用单位时间的荧光强度变化除以参加反应的蛋白量,求出单位质量的蛋白单位时间的荧光强度变化。

#### 注意事项:

为了您的安全和健康, 请穿实验服并戴一次性手套操作。

**本产品仅供科研使用, 不可用于临床诊断应用或其他用途。**