**实验七 GUS报告基因的检测**

**一、实验目的**

学习转基因植物中报告基因的定性检测方法和技术。

**二、实验原理**

GUS能与显色底物X-gluc 反应，显现蓝色，因而可以通过组织化学染色定性的研究*GUS*的表达水平和表达模式，而且GUS 染色的稳定性好，组织定位精确，在植物转基因过程中可作为报告基因来反映质粒侵染的情况。

**三、实验仪器、药品、材料与试剂**

1．仪器：37℃保温箱、电子天平、移液器、体式显微镜

2．药品与材料：Na2HPO4、Triton X-100、铁氰化钾、亚铁氰化钾、EDTA、X-Gluc、ddH2O

3、试剂：磷酸缓冲液

**四、实验内容与步骤**

1．按表1配制GUS染色的底物。

2．染色步骤

1)   染色：加入适量配制好的GUS 染液于24孔板的孔中，将待测样品浸到GUS染液中，将24孔板置于37℃保温箱中放置6h。

2)   漂洗：先后用50%，70%，100%的乙醇漂洗样品，每次浸泡5分钟。

3)   脱色：加入100%乙醇浸泡直至完全脱色。

4)   记录：在体式显微镜下拍照记录。

**五、观察记载内容与实验报告**

1、观察并记录转基因甜瓜/烟草愈伤组织染色情况。

2、记录转化率。转化率=蓝色愈伤组织数/总接种愈伤组织数 \*100%

表1. GUS染色底物的配制

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 试剂名称 | 母液浓度 | 母液配制方法 | 工作液浓度 | 工作液配制方法 |
| 磷酸缓冲液（pH 7.2） | 0.5M | 将0.5M Na2HPO4 和0.5M NaH2PO4 混合\* | 50mM | 1 ml |
| Triton X-100 | 10% | 取10ml Triton X-100溶于水，定容至100ml。 | 0.1% | 0.1 ml |
| 铁氰化钾 K3Fe(CN)6 | 100mM | 将3.2924g铁氰化钾溶于水，定容至100ml。 | 2 mM | 0.2 ml |
| 亚铁氰化钾  K4[Fe(CN)6] ·3 H2O | 100mM | 将4.2239g亚铁氰化钾溶于水，定容至100ml。 | 2 mM | 0.2 ml |
| EDTA | 0.5M | 将18.61g  Na2EDTA·2H2O溶于水，调pH为8.0，定容至100ml水。 | 10 mM | 0.2 ml |
| X-Gluc | / | / | 2 mM | 10.4mg |
| ddH2O | / | / | / | 定容至10ml |

\* 0.5M Na2HPO4配制方法：将17.907g Na2HPO4溶于水，定容至100ml。0.5M NaH2PO4的配制方法：将7.800g NaH2PO4溶于水，定容至100ml。