

## 谷氨酸脱羧酶（GAD）测定试剂盒说明书

（微板法 48 样）

### 一、产品简介：

谷氨酸脱羧酶 (GAD, EC 4.1.1.15) 是一种吡哆醛类裂解酶，能专一的催化 L-谷氨酸裂解成为  $\gamma$ -氨基丁酸 (GABA) 和  $\text{CO}_2$ 。GAD 广泛分布于动植物和微生物中：哺乳动物体内 GAD 催化产生的 GABA 是一种重要的抑制性神经递质；在植物中 GAD 的活性高低可指示种子发芽能力和出苗率等。

本试剂盒利用苯酚和次氯酸钠比色法测定谷氨酸脱羧酶（GAD）催化产生的 GABA，最终生成蓝色物质，该物质在 578nm 有最大光吸收，其颜色深浅与 GABA 含量呈正比，进而得出 GAD 活力大小。

### 二、试剂盒组成和配制：

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 60mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂一	粉体 mg×1 瓶	4℃ 保存	临用前甩几下，使粉体落到底部，再加入 5mL 试剂二溶解备用，
试剂二	液体 10mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂三	液体 8mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂四	液体 0.8mL×1 支	4℃ 保存	
试剂五	液体 3.5mL×1 瓶	4℃ 保存	
标准品	粉体 mg×1 支	4℃ 保存	若重新做标曲，则用到该标曲。

### 三、所需的仪器和用品：

酶标仪、96 孔板、水浴锅、离心机、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水。

### 四、谷氨酸脱羧酶（GAD）活性测定：

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定，了解本批样品情况，熟悉实验流程，避免实验样本和试剂浪费！

#### 1、样本制备：

##### ① 组织样本：

取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液，冰浴匀浆，12000rpm，4℃ 离心 10min，取上清液待用。

【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/细胞样本：

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 200W，超声 3s，间隔 10s，重复 30 次）；12000rpm 4℃ 离心 10min，取上清，置冰上待测。

【注】：若增加样本量，可按照细菌/细胞数量 ( $10^4$ )：提取液 (mL) 为 500~1000：1 的比例进行提取。

##### ③ 液体样本：直接检测。若浑浊，离心后取上清检测。

#### 2、上机检测：

① 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 578nm。

② 在 EP 管依次加入：

试剂名称 ( $\mu\text{L}$ )	测定管	对照管
样本	40	40
试剂一	80	

试剂二		80
混匀，40℃孵育 30min		
试剂三	80	80
混匀，室温 12000rpm，离心 3min，上清液待测。		

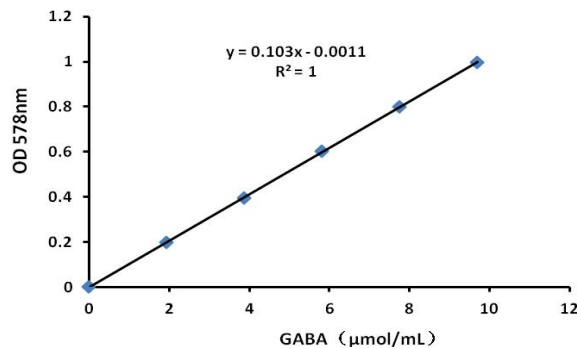
③ 显色反应：在 96 孔板中依次加入(根据待测样本数，试剂四和五可按照 3:32 的比例预混合，混合液现配现用)：

上清液	40	40
试剂四	3	3
试剂五	32	32
充分混匀，25℃放置 30min		
蒸馏水	160	160
混匀，于 578nm 处读取吸光值 A， $\Delta A=A$ 测定-A 对照（每个测定管设一个对照管）。		

【注】若 $\Delta A$  的值在零附近徘徊，则可延长孵育时间 T（如增至 1h 或更长），或加大样本量 V1（如增至 60 $\mu$ L，则试剂三相应减少），则改变后的反应（孵育）时间 T 或加样体积 V1 需代入计算公式重新计算。

## 五、结果计算：

1.标准曲线： $y = 0.103x - 0.0011$ ，x 为标准品摩尔浓度( $\mu$ mol/mL)，y 为吸光值 $\Delta A$ 。



2、按样本蛋白浓度计算：

单位定义：每毫克组织蛋白每小时产生 1 $\mu$ mol 的 GABA 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{谷氨酸脱羧酶 (GAD) 活力 } (\mu\text{mol/h/mg prot}) &= [(\Delta A + 0.0011) \div 0.103] \times V2 \div (V1 \times Cpr) \div T \\ &= 97.1 \times (\Delta A + 0.0011) \div Cpr \end{aligned}$$

3、按样本鲜重计算：

单位定义：每克组织每小时产生 1 $\mu$ mol 的 GABA 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{谷氨酸脱羧酶 (GAD) 活力 } (\mu\text{mol/h/g 鲜重}) &= [(\Delta A + 0.0011) \div 0.103] \times V2 \div (W \times V1 \div V) \div T \\ &= 97.1 \times (\Delta A + 0.0011) \div W \end{aligned}$$

4、按细胞数量计算：

单位定义：每 10<sup>4</sup> 个细胞每小时产生 1 $\mu$ mol 的 GABA 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{谷氨酸脱羧酶 (GAD) 活力 } (\mu\text{mol/h}/10^4 \text{ cell}) &= [(\Delta A + 0.0011) \div 0.103] \times V2 \div (500 \times V1 \div V) \div T \\ &= 0.194 \times (\Delta A + 0.0011) \end{aligned}$$

5、液体中 GAD 活力的计算：

单位定义：每毫升液体每小时产生 1 $\mu$ mol 的 GABA 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{谷氨酸脱羧酶 (GAD) 活力 } (\mu\text{mol/h/mL}) &= [(\Delta A + 0.0011) \div 0.103] \times V2 \div V1 \div T \\ &= 97.1 \times (\Delta A + 0.0011) \end{aligned}$$

V---提取液体积, 1mL;                      V1---加入反应体系中样本体积, 0.04mL;  
V2---反应体系总体积: 0.2mL;            T---反应时间, 30min=0.5h;  
W---样本质量, g;                            标准品 GABA 分子量---103.12;  
500---细胞数量;  
Cpr----样本蛋白质浓度, mg/mL, 建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。

附: 标准曲线制作过程:

- 1 标准品母液 (1mg/mL):
- 2 把母液稀释成以下浓度梯度的标准品: 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1 mg/mL。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
- 3 按照显色反应阶段的测定管加样体系操作, 根据结果即可制作标准曲线。