

谷氨酸脱羧酶（GAD）测定试剂盒说明书

（分光法 24 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 γ -氨基丁酸 (GABA) 和 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 30mL×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 7mL×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：

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）、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 可见分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 578nm，蒸馏水调零。

② 在 EP 管依次加入：

试剂名称 (μL)	测定管	对照管
样本	80	80

试剂一	160	
试剂二		160
混匀, 40℃孵育 30min		
试剂三	160	160
混匀, 室温 12000rpm, 离心 3min, 上清液待测。		

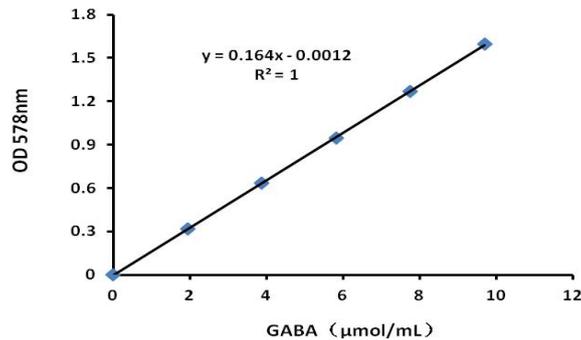
③ 显色反应: 在 96 孔板中依次加入(根据待测样本数, 试剂四和五可按照 12:128 的比例预混合, 混合液现配现用):

上清液	160	160
试剂四	12	12
试剂五	128	128
充分混匀, 25℃放置 30min		
蒸馏水	640	640
混匀, 于 578nm 处读取吸光值 A, $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ (每个测定管设一个对照管)。		

【注】若 ΔA 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 100 μ 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: $y = 0.164x - 0.0012$, x 为标准品摩尔浓度(μ mol/mL), y 为吸光值 ΔA 。



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 μ mol 的 GABA 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{谷氨酸脱羧酶 (GAD) 活力 } (\mu\text{mol/h/mg prot}) &= [(\Delta A + 0.0012) \div 0.164] \times V2 \div (V1 \times Cpr) \div T \\ &= 61 \times (\Delta A + 0.0012) \div Cpr \end{aligned}$$

3、按样本鲜重计算:

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

$$\begin{aligned} \text{谷氨酸脱羧酶 (GAD) 活力 } (\mu\text{mol/h/g 鲜重}) &= [(\Delta A + 0.0012) \div 0.164] \times V2 \div (W \times V1 \div V) \div T \\ &= 61 \times (\Delta A + 0.0012) \div W \end{aligned}$$

4、按细胞数量计算:

单位定义: 每 10⁴ 个细胞每小时产生 1 μ mol 的 GABA 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{谷氨酸脱羧酶 (GAD) 活力 } (\mu\text{mol/h}/10^4 \text{ cell}) &= [(\Delta A + 0.0012) \div 0.164] \times V2 \div (500 \times V1 \div V) \div T \\ &= 0.122 \times (\Delta A + 0.0012) \end{aligned}$$

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 μ mol 的 GABA 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{谷氨酸脱羧酶 (GAD) 活力 } (\mu\text{mol/h/mL}) &= [(\Delta A + 0.0012) \div 0.164] \times V2 \div V1 \div T \\ &= 61 \times (\Delta A + 0.0012) \end{aligned}$$

V---提取液体积, 1mL; V1---加入反应体系中样本体积, 0.08mL;
V2---反应体系总体积: 0.4mL; 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。
-