

## 谷氨酸脱羧酶（GAD）测定试剂盒说明书

（货号：G1102W 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 645nm 处有明显光吸收，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°C 保存	
试剂一	粉体 mg×1 瓶	4°C 保存	临用前甩几下，使粉体落到底部，再加入 11mL 试剂二溶解备用，
试剂二	液体 22mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂三	液体 30mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂四	液体 1mL×1 支	4°C 保存	
试剂五	液体 8mL×1 瓶	4°C 保存	
试剂六	A: 液体 4mL×2 瓶 B: 液体 5mL×1 瓶	4°C 保存	临用前取 2mL 的 B 液进一瓶 A 液中，混匀后作为试剂六使用。混匀后的试剂半个月用完。
标准品	粉体 mg×1 支	4°C 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°C 离心 10min，取上清液待用。
- 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°C 离心 10min，取上清，置冰上待测。
- 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 645nm，在 EP 管依次加入：

试剂名称 (μL)	测定管	对照管
样本	100	100
试剂一	200	
试剂二		200
混匀，40°C 孵育 30min		
试剂三	200	200

混匀，室温 12000rpm，离心 3min，上清液待测。

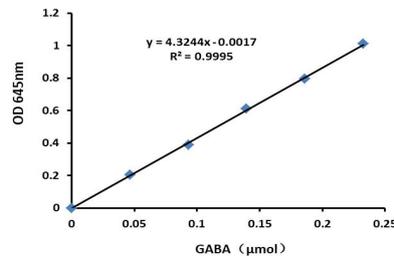
② 显色反应：在 96 孔板中依次加入：

上清液	80	80
试剂三	50	50
试剂四	10	10
试剂五	80	80
试剂六	80	80
混匀，20°C放置 20min，于 645nm 处读取各管的 A 值， $\Delta A = A_{\text{对照}} - A_{\text{测定}}$ (每个样本需做一个自身对照)。		

【注】若  $\Delta A$  值在零附近，可增加样本质量 W（如增至 0.2g），或延长 40°C 孵育时间 T（如增至 1h 或更长），或加大样本量 V1（如增至 100 $\mu$ L，则试剂一和二相应减少），或增加②步中上清液体积（由 80 $\mu$ L 增至 130 $\mu$ L 则试剂三相应减少），则改变后的 W 和 T 和 V1 和 V3 需代入计算公式重新计算。

## 五、结果计算：

1、标准曲线： $y = 4.3244x - 0.0017$ ，x 为标准品摩尔质量( $\mu$ mol)，y 为吸光值  $\Delta A$ 。



2、按样本蛋白浓度计算：

单位定义：每毫克组织蛋白每分钟产生 1nmol 的 GABA 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{GAD}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) &= [(\Delta A + 0.0017) \div 4.3244] \times (V2 \div V3) \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T \times 10^3 \\ &= 481.8 \times (\Delta A + 0.0017) \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

3、按样本鲜重计算：

单位定义：每克组织每分钟产生 1nmol 的 GABA 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{GAD}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) &= [(\Delta A + 0.0017) \div 4.3244] \times (V2 \div V3) \div (W \times V1 \div V) \div T \times 10^3 \\ &= 481.8 \times (\Delta A + 0.0017) \div W \end{aligned}$$

4、按细胞数量计算：

单位定义：每  $10^4$  个细胞每分钟产生 1nmol 的 GABA 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{GAD}(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) &= [(\Delta A + 0.0017) \div 4.3244] \times (V2 \div V3) \div (500 \times V1 \div V) \div T \times 10^3 \\ &= 0.964 \times (\Delta A + 0.0017) \end{aligned}$$

5、按照液体体积计算：

单位定义：每毫升液体每分钟产生 1nmol 的 GABA 定义为一个酶活力单位。

$$\text{GAD}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mL}) = [(\Delta A + 0.0017) \div 4.3244] \times (V2 \div V3) \div V1 \div T \times 10^3 = 481.8 \times (\Delta A + 0.0017)$$

V---提取液体积，1mL；

V1---加入反应体系中样本体积，0.1mL；

V2---反应体系总体积，0.5mL；

V3---第②步显色阶段上清液量，0.08mL； T---反应时间，30min；

W---样本质量，g； 标准品 GABA 分子量---103.12； 500---细胞数量，万；

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)：向 EP 管中加入 2mL 蒸馏水；把母液稀释成以下浓度梯度：0, 0.06, 0.12, 0.18, 0.24, 0.3 mg/mL。也可根据实际样本来调整标准品浓度。

2 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。