

## 谷氨酸脱羧酶 ((Glutamate decarboxylase, GAD) 试剂盒

分光光度法 50 管/24 样

**注 意：**正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

### 测定意义：

谷氨酸脱羧酶是将谷氨酸转化成抑制性神经递质  $\gamma$ -氨基丁酸 (GABA) 的限速酶， $\gamma$ -氨基丁酸是中枢神经系统中有效的抑制性神经递质，具有降血压、增进脑活力、营养神经细胞、保持神经安定、促进生长激素分泌和保肝利肾等作用，目前在医药和保健食品中已有广泛的应用。

### 测定原理：

GAD 催化谷氨酸产生 GABA，利用 berthelot 反应测定 GABA 含量，从而测定 GAD 活性。

### 需自备的仪器和用品：

分光光度计、水浴锅、可调式移液器、1mL 玻璃比色皿、研钵、冰和蒸馏水。

### 试剂的组成和配制：

提取液：液体 30mL×1 瓶，4℃保存；

试剂一：液体 6mL×1 瓶，4℃保存；

试剂二：液体 6mL×1 瓶，4℃避光保存；

试剂三：液体 5mL×1 瓶，4℃保存；

试剂四：液体 10mL×1 瓶，4℃保存；

试剂五：液体 20mL×1 瓶，4℃避光保存；

试剂六：液体 20mL×1 瓶，4℃保存；

试剂七：液体 35mL×1 瓶，4℃保存。

#### 样品测定的准备：

1、细菌或细胞的处理：收集细菌或细胞到离心管内，离心后弃上清；按照细菌或细胞数量（ $10^4$  个）：提取液体积（mL）为 500~1000: 1 的比例（建议 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 20%或 200W，超声 3S，间隔 10S，重复 30 次）；8000g，4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

2、组织的处理 按照组织质量（g）：提取液体积(mL)为 1: 5~10 的比例（建议称取约 0.1g 组织，加入 1mL 提取液），冰浴中匀浆。8000g ，4℃离心 10min，取上清，置冰上待测。

#### 测定步骤

1、在 EP 管中加入如下试剂

试剂名称（ $\mu$ L）	对照管	测定管
样本		100
95℃水浴灭活样本	100	1
试剂一	100	100
试剂二	100	100

混匀，40℃水浴反应 1h，95℃水浴 10 分钟终止反应，冷却至室温，取反应液待用。

2、在新 EP 管中加入如下试剂

反应液	120	120
试剂三	30	30
试剂四	300	300
试剂五		
混匀，室温静置 5min。		
试剂六	300	300
混匀，室温静置 5min		
试剂七	600	600

混匀，取 1mL 于 1mL 玻璃比色皿，测定 640nm 下吸光值 A 测定与 A 对照， $\Delta A=A$  测定-A 对照，每个测定管设一个对照管。

#### GAD 活力计算：

1、标准条件下测定回归方程为  $y = 0.1364x - 0.0432$ ， $R^2 = 0.999$ ；x 为标准品浓度（ $\mu\text{mol/mL}$ ），

y 为吸光值。

#### 2、按照蛋白浓度计算

单位的定义：每 mg 组织蛋白每分钟催化产生  $1\mu\text{mol GABA}$  定义为一个酶活力单位。GAD 活力( $\mu\text{mol/min/mg prot}$ )= $(\Delta A+0.0432) \div 0.1364 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 0.366 \times (\Delta A+0.0432) \div C_{\text{pr}}$

#### 3、按样本鲜重计算

单位的定义：每 g 组织每分钟催化产生  $1\mu\text{mol GABA}$  定义为一个酶活力单位。GAD 活力( $\mu\text{mol/min/g 鲜重}$ )= $(\Delta A+0.0432) \div 0.1364 \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.366 \times (\Delta A+0.0432) \div W$

#### 4、按细菌或细胞密度计算

单位的定义：每 1 万个细菌或细胞每分钟催化产生  $1\mu\text{mol GABA}$  定义为一个酶活力单位。GAD 活力( $\mu\text{mol/min}/10^4 \text{ cell}$ )= $(\Delta A+0.0432) \div 0.1364 \times V_{\text{反总}} \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$

$= 0.0007 \times (\Delta A+0.0432) V_{\text{样}}$ ；加入样本体积：0.1mL； $V_{\text{样总}}$ ：加入提取液体积，1 mL； $V_{\text{反总}}$ ：反应体系总体积，

0.3mL； $C_{\text{pr}}$ ：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g；500：细菌或细胞总数，500 万；T：反应时间，

60min。