

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

微量法 100 管/48 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 γ -氨基丁酸（GABA）的限速酶， γ -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：

酶标仪、水浴锅、可调式移液器、96 孔板、研钵、冰和蒸馏水。

试剂的组成和配制：

提取液：液体 60mL×1 瓶，4℃保存；

试剂一：液体 12mL×1 瓶，4℃保存；

试剂二：液体 12mL×1 瓶，4℃避光保存；

试剂三：液体 5mL×1 瓶，4℃保存；

试剂四：液体 6mL×1 瓶，4℃保存；

试剂五：液体 12mL×1 瓶，4℃避光保存；

试剂六：液体 12mL×1 瓶，4℃保存；

试剂七：液体 25mL×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（10⁴ 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 (μL)	对照管	测定管
样本		100
95℃水浴灭活样本	100	50
试剂一	100	950
试剂二	100	100

2、在新 EP 管中加入如下试剂

反应液	40	40
试剂三	10	10
试剂四	50	50
试剂五	100	100
试剂二	100	100
混匀，室温静置 5min		
试剂六	100	100
混匀，室温静置 5min。		
试剂七	200	200

混匀，取 200 μL 于 96 孔板，测定 640nm 下吸光值 A 测定与 A 对照， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ ，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 $y = 0.0682x - 0.0432$ ， $R^2 = 0.999$ ；x 为标准品浓度 (μmol/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 μmol GABA 定义为一个酶活力单位。GAD 活力(μmol/min/mg prot) = $(\Delta A + 0.0432) \div 0.0682 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T$

$$= 0.733 \times (\Delta A + 0.0432) \div C_{\text{pr}}$$

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 μmol GABA 定义为一个酶活力单位。GAD 活力(μmol/min/g 鲜重) = $(\Delta A + 0.0432) \div 0.0682 \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$

$$= 0.733 \times (\Delta A + 0.0432) \div W$$

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 μmol GABA 定义为一个酶活力单位。GAD 活力

$$\text{mol/min/104 cell} = (\Delta A + 0.0432) \div 0.0682 \times V_{\text{反总}} \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T$$
$$= 0.0014 \times (\Delta A + 0.0432)$$

V 样：加入样本体积，0.1mL；V 样总：加入提取液体积，1 mL；V 反总：反应体系总体积，

0.3mL；Cpr：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。