

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

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°C 保存；

试剂一：液体 12mL×1 瓶，4°C 保存；

试剂二：液体 12mL×1 瓶，4°C 避光保存；

试剂三：液体 5mL×1 瓶，4°C 保存；

试剂四：液体 6mL×1 瓶，4°C 保存；

试剂五：液体 12mL×1 瓶，4°C 避光保存；

试剂六：液体 12mL×1 瓶，4°C 保存；

试剂七：液体 25mL×1 瓶，4°C 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°C 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°C 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（ μ L）	对照管	测定管
样本		100
95°C 水浴灭活样本	100	
试剂一	100	100
试剂二	100	100

混匀，40°C 水浴反应 1h，95°C 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	40	40
试剂三	10	10
试剂四	50	50
试剂五	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 μ L 于 96 孔板，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 $y = 0.0682x - 0.0432$ ， $R^2 = 0.999$ ；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 μmol GABA 定义为一个酶活力单位。GAD 活力 ($\mu\text{mol/min/mg prot}$)= $(\Delta A+0.0432) \div 0.0682 \times V$ 反总 $\div(V$ 样 $\times C_{pr}) \div T$
 $=0.733 \times (\Delta A+0.0432) \div C_{pr}$

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 ($\mu\text{mol/min/g 鲜重}$)= $(\Delta A+0.0432) \div 0.0682 \times V$ 反总 $\div(W \times V$ 样 $\div V$ 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 ($\mu\text{mol/min}/10^4 \text{ cell}$)= $(\Delta A+0.0432) \div 0.0682 \times V$ 反总 $\div(500 \times V$ 样 $\div V$ 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。