

Glutamate decarboxylase (GAD) Activity Assay Kit

谷氨酸脱羧酶（GAD）测定试剂盒说明书

货号: BN72238 | 方法: 微板法 | 规格: 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 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 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:

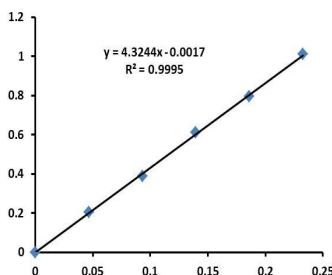
上清液	80	80
试剂三	50	50
试剂四	10	10
试剂五	80	80
试剂六	80	80
混匀, 20°C放置 20min, 于 645nm 处读取各管的 A 值, $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ (每个样本需做一个自身对照)。		

注意: 本操作流程适用于绝大多数常规样本检测, 实验条件可根据实际样本状态适度微调;

针对特殊类型样本, 我司技术支持可提供专属优化建议。

五、结果计算:

1、标准曲线: $y = 4.3244x - 0.0017$, x 为标准品摩尔质量(μmol), y 为吸光值 ΔA 。



标准曲线示意图

说明: 标准曲线由标准品测定获得, 具体制作方法详见随货说明书或咨询技术支持。

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。

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

$$= 481.8 \times (\Delta A + 0.0017) \div \text{Cpr}$$

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。

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

$$= 481.8 \times (\Delta A + 0.0017) \div W$$

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。

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

$$= 0.964 \times (\Delta A + 0.0017)$$

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;