

谷氨酸脱羧酶（GAD）测定试剂盒说明书

货号: BN72239 | 方法: 微板法 | 规格: 24 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 30mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	粉体 mg×1 瓶	4℃保存	临用前甩几下, 使粉体落到底部, 再加入 6mL 试剂二溶解备用。
试剂二	液体 12mL×1 瓶	4℃保存	
试剂三	液体 20mL×1 瓶	4℃保存	
试剂四	液体 1.5mL×1 瓶	4℃保存	
试剂五	液体 12mL×1 瓶	4℃保存	
试剂六	A: 液体 4.4mL×2 瓶 B: 液体 5mL×1 瓶	4℃保存	临用前取 2.2mL 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内存用。
标准品	粉体 mg×1 支	4℃保存	若重新做标曲, 则用到该标曲。

三、所需的仪器和用品:

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm)、水浴锅、离心机、可调式移液器。

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℃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℃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 可见分光光度计预热 30min 以上, 调节波长至 645nm, 蒸馏水调零。
- ② 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℃孵育 30min。		
试剂三	200	200
混匀，室温 12000rpm，离心 3min，上清液待测。		

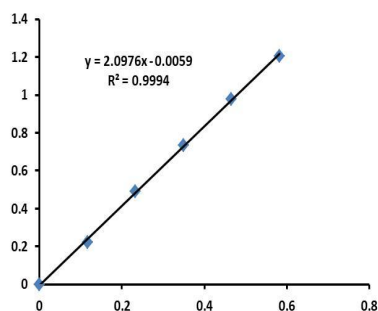
③ 显色反应：在 EP 管中依次加入：

上清液	200	200
试剂三	125	125
试剂四	25	25
试剂五	200	200
试剂六	200	200
混匀，20℃放置 20min，取全部澄清上清液至 1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）中，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： $y = 2.0976x - 0.0059$ ，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。

$$\text{GAD}(\text{nmol/min/mg prot}) = [(\Delta A + 0.0059) \div 2.0976] \times (V_2 \div V_3) \div (V_1 \times C_{\text{pr}}) \div T \times 10^3$$

$$= 397.3 \times (\Delta A + 0.0059) \div C_{\text{pr}}$$

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。

$$\text{GAD}(\text{nmol/min/g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0059) \div 2.0976] \times (V_2 \div V_3) \div (W \times V_1 \div V) \div T \times 10^3$$

$$= 397.3 \times (\Delta A + 0.0059) \div W$$

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。

$$\text{GAD}(\text{nmol/min}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.0059) \div 2.0976] \times (V_2 \div V_3) \div (500 \times V_1 \div V) \div T \times 10^3$$

$$= 0.8 \times (\Delta A + 0.0059)$$

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。

$$\text{GAD}(\text{nmol/min/mL}) = [(\Delta A + 0.0059) \div 2.0976] \times (V_2 \div V_3) \div V_1 \div T = 397.3 \times (\Delta A + 0.0059)$$

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, 0.2mL; 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。