

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 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：

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（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（ μ 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，1mL； $V_{\text{反总}}$ ：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。