

## 谷氨酸脱羧酶（GAD）检测试剂盒（微量法）

**注意：正式测定之前选择 2-3 个预期差异大的样本做预测定。**

### 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 $\gamma$ -氨基丁酸（GABA）的限速酶， $\gamma$ -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。

### 试剂组成和配制：

- 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（ $10^4$  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℃ 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（ $\mu$ L）	对照管	测定管
样本		100
95℃水浴灭活样本	100	
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	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 200μL 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  $1\mu\text{mol}$  GABA 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{GAD 活力}(\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg prot}) &= (\Delta A + 0.0432) \div 0.0682 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T \\ &= 0.733 \times (\Delta A + 0.0432) \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

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。

$$\begin{aligned} \text{GAD 活力}(\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) &= (\Delta A + 0.0432) \div 0.0682 \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 0.733 \times (\Delta A + 0.0432) \div W \end{aligned}$$

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。

$$\begin{aligned} \text{GAD 活力}(\mu\text{mol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) &= (\Delta A + 0.0432) \div 0.0682 \times V_{\text{反总}} \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 0.0014 \times (\Delta A + 0.0432) \end{aligned}$$

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。