

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

分光光度法 50 管/24 样

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 $\gamma$ -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。

## 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°C保存;

试剂一: 液体 6mL×1 瓶, 4°C保存;

试剂二: 液体 6mL×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 10mL×1 瓶, 4°C保存;

试剂五: 液体 20mL×1 瓶, 4°C避光保存;

试剂六: 液体 20mL×1 瓶, 4°C保存;

试剂七: 液体 35mL×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 ( $\mu$ 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	120	120
试剂三	30	30
试剂四	150	150
试剂五	300	300

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。

$$\begin{aligned} \text{GAD 活力}(\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg prot}) &= (\Delta A + 0.0432) \div 0.1364 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times \text{Cpr}) \div T \\ &= 0.366 \times (\Delta A + 0.0432) \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

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。

$$\begin{aligned} \text{GAD 活力}(\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) &= (\Delta A + 0.0432) \div 0.1364 \times V_{\text{反总}} \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 0.366 \times (\Delta A + 0.0432) \div W \end{aligned}$$

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。

$$\begin{aligned} \text{GAD 活力}(\mu\text{mol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) &= (\Delta A + 0.0432) \div 0.1364 \times V_{\text{反总}} \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 0.0007 \times (\Delta A + 0.0432) \end{aligned}$$

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。