

谷氨酸脱羧酶（GAD）测定试剂盒说明书

（货号：BP10424W 微板法 48 样 有效期：3 个月）

一、指标介绍：

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：

试剂组分	试剂规格	存放温度	注意事项
提取液	液体 60mL×1 瓶	4℃避光保存	
试剂一	粉体 1 瓶	4℃保存	1. 开盖前注意使粉体落入底部（可手动甩一甩）； 2. 加入 11mL 试剂二溶解备用； 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂二	液体 22mL×1 瓶	4℃保存	
试剂三	液体 30mL×1 瓶	4℃保存	
试剂四	液体 1mL×1 支	4℃保存	
试剂五	液体 8mL×1 瓶	4℃避光保存	
试剂六	A: 液体 4mL×2 瓶	4℃保存	1. 临用前取 2mL 的 B 液进一瓶 A 液中，混匀后作为试剂六使用； 2. 混匀后的试剂半月内用完。
	B: 液体 5mL×1 瓶	4℃避光保存	
标准品	粉体 1 支	4℃保存	1. 若重新做标曲，则用到该试剂； 2. 按照说明书中标曲制作步骤进行配制； 3. 溶解后的标品一周内用完。

三、实验器材：

研钵（匀浆机）、冰盒（制冰机）、台式离心机、可调式移液枪、水浴锅（烘箱、培养箱、金属浴）、96 孔板、离心管、酶标仪、蒸馏水（去离子水、超纯水均可）。

四、指标测定：

建议先选取 1-3 个差异大的样本（例如不同类型或分组）进行预实验，熟悉操作流程，根据预实验结果确定或调整样本浓度，以防造成样本或试剂不必要的浪费！

1、样本提取：

- 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、检测步骤：

- ① 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 645nm，在 EP 管依次加入：

试剂组分 (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。		

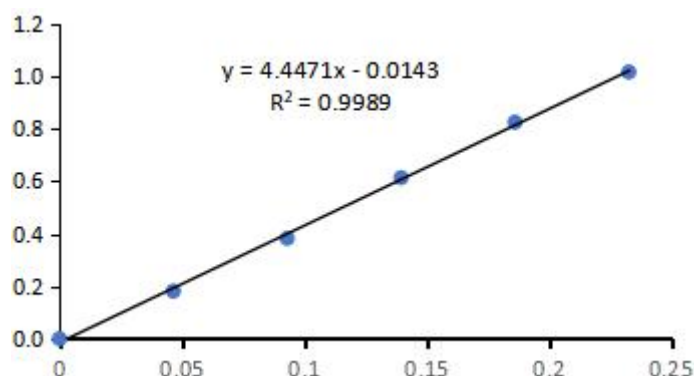
② 显色反应：在 96 孔板中依次加入：

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】若 ΔA 值在零附近, 可增加样本质量 W (如增至 0.2g), 或延长 40°C 孵育时间 T (如增至 1h 或更长), 或加大样本量 $V1$ (如增至 150μL, 则试剂一和二相应减少), 或增加②步中上清液体积 $V3$ (由 80μL 增至 130μL 则试剂三相应减少), 则改变后的 W 和 T 和 $V1$ 和 $V3$ 需代入计算公式重新计算。

五、结果计算：

1、标准曲线： $y = 4.4471x - 0.0143$, x 为标准品摩尔质量(μmol), y 为吸光值 ΔA 。



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。

$$\begin{aligned} \text{GAD}(\text{nmol}/\text{min}/\text{mg prot}) &= [(\Delta A + 0.0143) \div 4.4471] \times (V2 \div V3) \div (V1 \times C_{\text{pr}}) \div T \times 10^3 \\ &= 468.5 \times (\Delta A + 0.0143) \div C_{\text{pr}} \end{aligned}$$

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。

$$\begin{aligned} \text{GAD}(\text{nmol}/\text{min}/\text{g 鲜重}) &= [(\Delta A + 0.0143) \div 4.4471] \times (V2 \div V3) \div (W \times V1 \div V) \div T \times 10^3 \\ &= 468.5 \times (\Delta A + 0.0143) \div W \end{aligned}$$

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。

$$\begin{aligned} \text{GAD}(\text{nmol}/\text{min}/10^4 \text{ cell}) &= [(\Delta A + 0.0143) \div 4.4471] \times (V2 \div V3) \div (500 \times V1 \div V) \div T \times 10^3 \\ &= 0.937 \times (\Delta A + 0.0143) \end{aligned}$$

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。

$$GAD(nmol/min/mL)=[(\Delta A+0.0143)\div 4.4471]\times(V2\div V3)\div V1\div T\times 10^3=468.5\times(\Delta A+0.0143)$$

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;
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。

附：标准曲线制作过程：

- 1 向 EP 管中加入 2mL 蒸馏水，标准品母液浓度为 1mg/mL。将母液用蒸馏水稀释成六个浓度梯度的标准品，例如：0, 0.06, 0.12, 0.18, 0.24, 0.3 mg/mL。也可根据实际样本调整标准品浓度。
- 2 标品稀释参照表如下：

吸取标准品母液 200uL，加入 800uL 蒸馏水，混匀得到 0.3mg/mL 的标品稀释液待用。						
标品浓度 mg/mL	0	0.06	0.12	0.18	0.24	0.3
标品稀释液 uL	0	40	80	120	160	200
水 uL	200	160	120	80	40	0
各标准管混匀待用。						

- 3 依据加显色反应阶段的测定管样表操作，根据结果，以各浓度吸光值减去 0 浓度吸光值，过 0 点制作标准曲线。

试剂名称 (μL)	标准管	0 浓度管 (仅做一次)
标品	80	
蒸馏水		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， ΔA=A 测定-0 浓度管。		