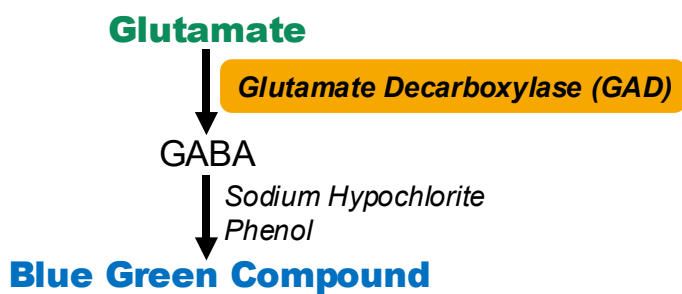




谷氨酸脱羧酶（GAD）活性检测试剂盒

Glutamic Acid Decarboxylase (GAD) Activity Assay Kit



北京盒子生工科技有限公司
Beijing Boxbio Science & Technology Co., Ltd.



谷氨酸脱羧酶（GAD）活性检测试剂盒

Glutamic Acid Decarboxylase (GAD) Activity Assay Kit

一、产品描述

谷氨酸脱羧酶在生物体中具有多种重要功能，主要参与谷氨酸代谢途径中的关键步骤，通过催化谷氨酸脱羧将谷氨酸转化为 γ -氨基丁酸，从而调节神经递质的平衡，在植物神经递质平衡和生长发育等过程中发挥重要作用，其活性分析对植物神经调节机制和植物抗逆性等研究具有重要意义。

谷氨酸脱羧酶可催化谷氨酸生成 γ -氨基丁酸，进一步与次氯酸钠和苯酚反应，生成水溶性蓝色染料靛酚蓝，产物在 640 nm 处具有特征吸收峰，通过吸光值变化即可表征谷氨酸脱羧酶的活性。

二、产品内容

名称	试剂规格	储存条件	使用方法及注意事项
提取液	液体 70 mL×1 瓶	4°C 保存	-
试剂一	液体 12 mL×1 瓶	4°C 保存	-
试剂二	液体 400 μ L×1 瓶	4°C 保存	使用前加入 9.6 mL 提取液充分混匀 (配制后 4°C 可保存一个月)
试剂三	液体 6 mL×1 瓶	4°C 保存	-
试剂四	液体 5 mL×1 瓶	4°C 保存	-
试剂五	液体 7 mL×1 瓶	4°C 保存	-
试剂六	液体 25 mL×1 瓶	4°C 保存	-
标准品	粉剂×1 支	4°C 保存	使用前加入 970 μ L 蒸馏水充分溶解 (即为 100 μ mol/mL γ -氨基丁酸标准液)
标准稀释液的制备 (现用现配): 使用前将 100 μ mol/mL γ -氨基丁酸标准液使用蒸馏水稀释 20 倍至 5 μ mol/mL 即为标准稀释液。			

三、产品使用说明

测定过程中所需要的仪器和试剂：酶标仪、96 孔板、研钵/匀浆器、可调式移液器、台式离心机、恒温水浴或培养箱和蒸馏水。

1. 粗酶液的制备 (可根据预实验结果适当调整样本量及比例)

①组织：按照组织质量 (g)：提取液体积 (mL) 为 1: (5-10) 的比例 (建议称取 0.1 g 组织，加入 1 mL 提取液) 处理样品，冰浴匀浆，4°C 8000 g 离心 10 min，取上清置于冰上待测。

②细菌或细胞:离心收集细菌或细胞至离心管内,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1 mL提取液)处理样品,冰浴超声破碎(功率200 W,超声3 s,间隔7 s,总时间5 min),4°C 8000 g离心10 min,取上清置于冰上待测。

③培养液等液体样本:直接测定或适当稀释后再进行测定,若样本浑浊需离心后取上清测定。

2.测定步骤

①酶标仪预热30 min以上,调节波长至640 nm。

②灭活酶液的制备:吸取200 μ L粗酶液,100°C处理10 min(密封以防止水分散失),冷却至室温,8000 g常温离心5 min,取上清即为灭活酶液。

③在离心管中依次加入下列试剂:

试剂	测定管 (μ L)	对照管 (μ L)	标准管 (μ L)	空白管 (μ L)
粗酶液	100	-	-	-
灭活酶液	-	100	-	-
试剂一	100	100	-	-
试剂二	100	100	-	-
①充分混匀,40°C准确反应6 h; ②立即100°C处理10 min,冷却至室温; ③4°C 8000 离心10 min,取上清液;				
上清液	30	30	-	-
标准稀释液	-	-	30	-
蒸馏水	-	-	-	30
试剂三	50	50	50	50
试剂四	40	40	40	40
充分混匀,室温静置5 min				
试剂五	60	60	60	60
充分混匀,100°C处理10 min,冷却至室温				
试剂六	200	200	200	200

注:100°C处理过程中注意密封以防止水分散失。

吸光值测定:吸取200 μ L反应液至96孔板中,测定640 nm处吸光值,记为A测定、A对照、A标准和A空白;计算 ΔA 测定=A测定-A对照, ΔA 标准=A标准-A空白。注:每个样品均需设一个对照管,标准管和空白管只需测定1-2次。

3.谷氨酸脱羧酶（GAD）活性计算

①按组织蛋白浓度计算

单位定义：每 mg 组织蛋白每分钟生成 1 nmol γ -氨基丁酸定义为一个酶活性单位。

$$\text{GAD (U/mg prot)} = \frac{C_{\text{标}} \times \Delta A_{\text{测定}} \times V_{\text{酶促}} \times D \times 10^3}{\Delta A_{\text{标准}} \times C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{41.67 \times \Delta A_{\text{测定}} \times D}{C_{\text{pr}} \times \Delta A_{\text{标准}}}$$

②按组织样本质量计算

单位定义：每 g 组织每分钟生成 1 nmol γ -氨基丁酸定义为一个酶活性单位。

$$\text{GAD (U/g)} = \frac{C_{\text{标}} \times \Delta A_{\text{测定}} \times V_{\text{酶促}} \times V_{\text{样总}} \times D \times 10^3}{\Delta A_{\text{标准}} \times W \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{41.67 \times \Delta A_{\text{测定}} \times D}{W \times \Delta A_{\text{标准}}}$$

③按细菌或细胞数量计算

单位定义：每 10^4 个细菌或细胞每分钟生成 1 nmol γ -氨基丁酸定义为一个酶活性单位。

$$\text{GAD (U/10}^4 \text{ cell)} = \frac{C_{\text{标}} \times \Delta A_{\text{测定}} \times V_{\text{酶促}} \times V_{\text{样总}} \times D \times 10^3}{\Delta A_{\text{标准}} \times \text{细菌或细胞数量} \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{41.67 \times \Delta A_{\text{测定}} \times D}{\text{细菌或细胞数量} \times \Delta A_{\text{标准}}}$$

④按液体样本体积计算

单位定义：每 mL 液体样本每分钟生成 1 nmol γ -氨基丁酸定义为一个酶活性单位。

$$\text{GAD (U/mL)} = \frac{C_{\text{标}} \times \Delta A_{\text{测定}} \times V_{\text{酶促}} \times D \times 10^3}{\Delta A_{\text{标准}} \times V_{\text{样}} \times T} = \frac{41.67 \times \Delta A_{\text{测定}} \times D}{\Delta A_{\text{标准}}}$$

注释： C 标：标准稀释液浓度，5 $\mu\text{mol/mL}$ ；V 酶促：酶促反应体系体积，0.3 mL；V 样：酶促反应体系中加入粗酶液的体积，0.1 mL；V 样总：粗酶液总体积，1 mL；Cpr：粗酶液蛋白浓度，mg/mL；W：样本质量，g；细菌或细胞数量：以万计；T：酶促反应时间，360 min；D：粗酶液稀释倍数，若未稀释则为 1； 10^3 ：单位换算系数，1 $\mu\text{mol}=1000 \text{ nmol}$ 。

四、注意事项

①准确在规定时间点完成吸光值测定，以确保实验结果的准确性和重复性；

②若 ΔA 测定大于 0.5 或 A 测定大于 1.0，建议将粗酶液使用提取液适当稀释后再进行测定；若 ΔA 测定小于 0.02，建议适当延长酶促反应时间或制备更高浓度样本后再进行测定，计算时相应修改；

③为保证结果准确且避免试剂损失，测定前请仔细阅读说明书（以实际收到说明书内容为准），确认试剂储存和准备是否充分，操作步骤是否清楚，且务必取 2-3 个预期差异较大的样本进行预测定，过程中问题请您及时与工作人员联系。

For Research Use Only. Not for Use in Diagnostic Procedures.

