

γ-氨基丁酸转氨酶（GABA-T）测定试剂盒说明书

（货号：BP10425W 微板法 48 样 有效期：3 个月）

一、指标介绍：

γ-氨基丁酸转氨酶(GABA-T, EC 2.6.1.96)是 GABA 支路中的关键酶之一，催化 GABA 的降解和转化。

本试剂盒利用γ-氨基丁酸转氨酶（GABA-T）催化丙酮酸和 GABA 反应生成琥珀酸半醛和丙氨酸，通过检测 GABA 的减少量进而得出 GABA-T 酶活力大小。

反应方程式：4-aminobutanoate + pyruvate = succinate semialdehyde + L-alanine。

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℃ 保存	
试剂一	液体 1 瓶	4℃ 保存	1. 开盖前注意使液体落入底部（可手动甩一甩）； 2. 加入 3mL 试剂三溶解备用； 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂二	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 4.5mL 试剂三溶解备用； 3. 保存周期与试剂盒有效期相同。
试剂三	液体 8mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂四	液体 11mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂五	A: 液体 8mL×3 瓶 B: 液体 2mL×1 支	4℃ 保存	1. 临用前取 0.55mL 的 B 液进一瓶 A 液中，混匀后作为试剂五使用； 2. 混匀后的试剂五半月内用完。
		4℃ 避光保存	
试剂六	液体 10mL×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：

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定，了解本批样本情况，熟悉实验流程，避免实验样本和试剂浪费！

1、样本提取：

- ① 组织样本：取约 0.1g 组织(水分充足的样本可取 0.5g)，加入 1mL 提取液，冰浴匀浆，12000rpm，4℃离心 10min，取上清液待用。

【注】：若增加样本量，可按照组织质量（g）：提取液体积（mL）为 1：5~10 的比例进行提取。

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：澄清的液体样本直接测定，若浑浊则离心后取上清检测。

2、检测步骤：

① 酶标仪预热 30min 以上，调节波长至 645nm。

② 所有试剂解冻至室温，在 EP 管依次加入：

试剂组分（μL）	测定管	对照管
样本	40	40
试剂一	40	
蒸馏水		40
试剂二	40	40
混匀，于 30℃ 孵育 30min		
试剂四	80	80
立即混匀，室温 12000rpm，离心 5min，上清液待测		

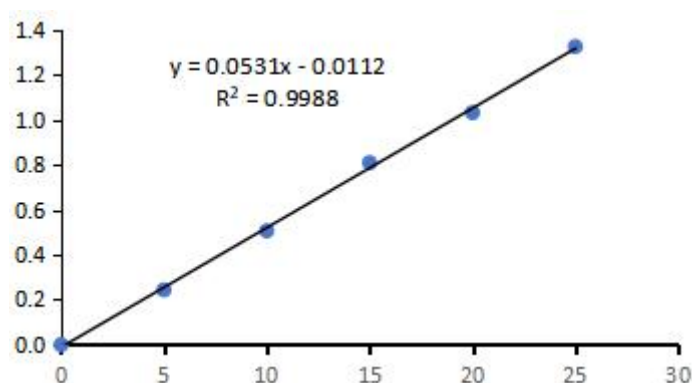
③ 显色反应：于 EP 管中依次加入：

上清液	50	50
试剂四	30	30
试剂五	200	200
试剂六	100	100
混匀，沸水浴（95-100℃）10min，冰浴至室温，呈现蓝绿色颜色，若浑浊需 12000rpm 离心 5min，取澄清的 200μL 至 96 孔板中，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 值小于 0.01，可增加样本质量 W（如增至 0.2g），或延长 30℃ 孵育时间 T（如增至 1h 或更长），或加大样本量 V1（如增至 80μL，则试剂四相应减少），则改变后的 W 和 T 和 V1 需代入计算公式重新计算。

五、结果计算：

1、标准曲线： $y = 0.0531x - 0.0112$ ，x 为标准品质量（μg），y 为吸光值 ΔA 。



2、按样本蛋白浓度计算：

单位定义：每毫克组织蛋白每小时消耗 1μg 的 GABA 定义为一个酶活力单位。

$$\text{GABA-T } (\mu\text{g/h/mg prot}) = [(\Delta A + 0.0112) \div 0.0531] \times (V2 \div V3) \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T$$

$$= 3766.5 \times (\Delta A + 0.0112) \div \text{Cpr}$$

3、按样本鲜重计算：

单位定义：每克组织每小时消耗 1μg 的 GABA 定义为一个酶活力单位。

$$\text{GABA-T } (\mu\text{g/h/g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0003) \div 0.0531] \times (V_2 \div V_3) \div (W \times V_1 \div V) \div T$$

$$= 3766.5 \times (\Delta A + 0.0112) \div W$$

4、按细菌/细胞数量计算：

单位定义：每 10⁴ 个细胞每小时消耗 1μg 的 GABA 定义为一个酶活力单位。

$$\text{GABA-T } (\mu\text{g/h/10}^4 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.0003) \div 0.0531] \times (V_2 \div V_3) \div (500 \times V_1 \div V) \div T$$

$$= 3766.5 \times (\Delta A + 0.0112) \div 500$$

5、液体中 GABA-T 含量计算：

单位定义：每毫升组织每小时消耗 1μg 的 GABA 定义为一个酶活力单位。

$$\text{GABA-T } (\mu\text{g/h/mL}) = [(\Delta A + 0.0003) \div 0.0531] \times (V_2 \div V_3) \div V_1 \div T$$

$$= 3766.5 \times (\Delta A + 0.0112)$$

V--提取液体积, 1mL; V1--加入反应体系样本体积, 0.04mL; W--样本质量, g; 500--细胞数量, 万;
V2--反应体系总体积, 0.2mL; V3--③步上清液的体积, 0.05mL; T--反应时间, 30min=0.5h;
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：

- 标准品用前甩几下使粉体落入底部，再加 2mL 蒸馏水溶解（两天内用完），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, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 mg/mL。也可根据实际样本调整标准品浓度。

- 标品稀释参照表如下：

吸取标准品母液 500uL，加入 500uL 蒸馏水，混匀得到 0.5mg/mL 的标品稀释液待用。						
标品浓度 mg/mL	0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
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。						

- 依据测定管加样表操作，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	50	
蒸馏水		50
试剂四	30	30
试剂五	200	200
试剂六	100	100
混匀，沸水浴 (95-100℃) 10min，冰浴至室温，呈现蓝绿色颜色，若浑浊需 12000rpm 离心 5min，取澄清的 200μL 至 96 孔板中，于 645nm 处读取各管的 A 值， $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{0 浓度管}}$ 。		