

γ-氨基丁酸（GABA）含量试剂盒说明书

（货号：BP10426F 分光法 48 样 有效期：3 个月）

一、指标介绍：

4-氨基丁酸（GABA）广泛分布在动植物体中。在动物体内 GABA 几乎只存在于神经组织中。在植物中如豆属、参属、中草药等的种子、根茎和组织液中都含有 GABA，且与植物的环境应激反应有关。

4-氨基丁酸（GABA）在碱性溶液中与次氯酸盐和苯酚反应生成蓝绿色物质，通过检测该有色物质在 645nm 波长处的值，即可得出样本中 GABA 的含量。

二、试剂盒的组分与配制：

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 4mL×1 瓶	4℃保存	
试剂二	液体 2mL×1 支	4℃避光保存	1. 临用前取出 0.13mL 试剂二至一支新 EP 管中； 2. 再向其中加入 1.87mL 蒸馏水混匀做为试剂二使用（该液体一周内用完）。
试剂三	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）、1ml 比色皿、离心管、分光光度计、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：称取约 0.1g 组织样本加入研钵中，加入 1mL 提取液，在冰上进行匀浆，12000rpm，4℃或室温离心 10min，取上清液待测。

【注】：若增加样本量，可按照组织质量（g）：提取液（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。

【注】：若增加样本量，可按照细菌/细胞数量（10⁴）：提取液（mL）为 500~1000：1 的比例进行提取。

- 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：

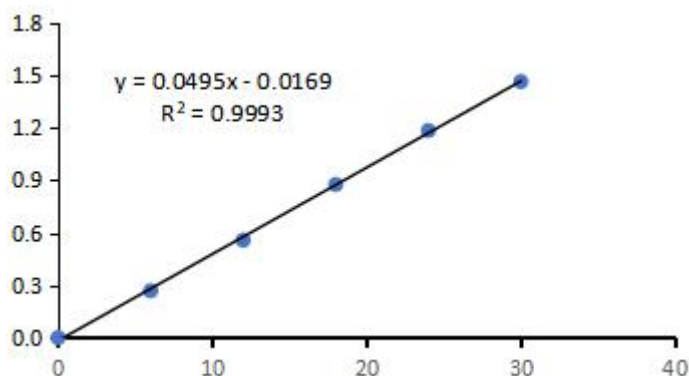
- ① 分光光度计预热 30 min，调节波长到 645 nm，蒸馏水调零。
- ② 所有试剂解冻至室温（25℃）。则试剂一和二可按照 60:400 的比例预先配制成混合液（用多少配多少，现配现用），在 EP 管中依次加入：

试剂组分 (μL)	测定管	空白管 (仅做一次)
样本	100	
蒸馏水		100
混合液	460	460
试剂三	200	200
混匀, 沸水浴 (95-100°C) 10min, 冰浴至室温, 若浑浊需 12000rpm 离心 5min, 取全部澄清上清液转移至 1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm) 中, 于 645nm 处读取各管的 A 值, $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{空白}}$ 。		

- 【注】1.若测定管的 A 值大于 1.5, 则需将样本进行稀释 (用蒸馏水稀释), 稀释倍数 D 需代入计算公式重新计算。
- 2.若 ΔA 值低于 0.01, 则可增加样本取样量 W (如增至 0.2g) 或增加样本加样量 V1 (如由 100μL 增至 200μL, 则混合液和试剂三均各自减少 50μL), 则 W 和 V1 代入计算公式重新计算。
- 3.若样本存在高背景值 (例如高含量的氨氮、铵根离子) 则不建议用此法检测。

五、结果计算:

- 1、标准曲线: $y = 0.0495x - 0.0169$, x 为标准品质量(μg), y 为吸光值 ΔA 。



- 2、按样本质量计算:

$$\text{GABA 含量}(\mu\text{g/g 重量}) = [(\Delta A + 0.0169) \div 0.0495] \div (W \times V1 \div V) \times D$$

$$= 202 \times (\Delta A + 0.0169) \div W \times D$$

- 3、按样本蛋白浓度计算:

$$\text{GABA 含量}(\mu\text{g/mg prot}) = [(\Delta A + 0.0169) \div 0.0495] \div (W \times V1 \div V) \times D$$

$$= 202 \times (\Delta A + 0.0169) \div W \times D$$

- 4、按细胞数量计算:

$$\text{GABA 含量}(\mu\text{g}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.0169) \div 0.0495] \div (500 \times V1 \div V) \times D = 0.404 \times (\Delta A + 0.0169) \times D$$

- 5、液体中 GABA 含量计算:

$$\text{GABA 含量}(\mu\text{g/mL}) = [(\Delta A + 0.0169) \div 0.0495] \div V1 \times D = 202 \times (\Delta A + 0.0169) \times D$$

V---提取液体积, 1mL;

V1---样本加入体积, 0.1mL;

D---稀释倍数, 未稀释即为 1;

W---样本取样质量;

500---细胞数量, 万;

Cpr---蛋白浓度 (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 标准品临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, 0.06, 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 300uL，加入 700uL 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	100	
蒸馏水		100
混合液	460	460
试剂三	200	200
混匀，沸水浴 (95-100°C) 10min，冰浴至室温，若浑浊需 12000rpm 离心 5min，取全部澄清上清液转移至 1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）中，于 645nm 处读取各管的 A 值， $\Delta A = A$ 测定-0 浓度管。		