

γ-氨基丁酸转氨酶（GABA-T）测定试剂盒说明书

微板法 48 样

一、产品简介：

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：

试剂名称	规格	保存要求	备注
提取液	液体 60mL×1 瓶	4℃ 保存	
试剂一	粉体 mg×1 支	4℃ 保存	临用前甩几下使粉剂落入底部，再加3mL 试剂三溶解备用。
试剂二	粉体 mg×1 支	4℃ 保存	临用前甩几下使粉剂落入底部，再加 4.5mL 试剂三溶解备用。
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	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。混匀后的试剂五半个月用完。
试剂六	液体 10mL×1 瓶	4℃ 保存	
标准品	粉体 mg×1 支	4℃ 保存	若重新做标曲，则用到该试剂。

三、所需的仪器和用品：

酶标仪、96 孔板、水浴锅、离心机、可调式移液器、研钵、冰和蒸馏水。

四、γ-氨基丁酸转氨酶（GABA-T）活性测定：

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、样本制备：

- 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。

2、上机检测：

- 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：

试剂名称（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		

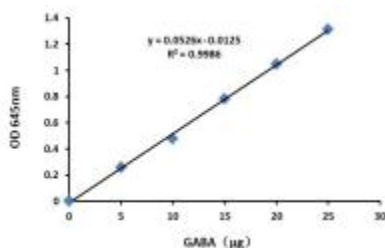
③ 显色反应：于 EP 管中依次加入：

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， $\Delta A = A_{\text{对照}} - A_{\text{测定}}$ (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： $y = 0.0526x - 0.0125$ ，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。

$$\text{GABA-T } (\mu\text{g/h/mg prot}) = [(\Delta A + 0.0125) \div 0.0526] \times (V2 \div V3) \div (V1 \times Cpr) \div T$$

$$= 3802.3 \times (\Delta A + 0.0125) \div Cpr$$

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。

$$\text{GABA-T } (\mu\text{g/h/g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0003) \div 0.0526] \times (V2 \div V3) \div (W \times V1 \div V) \div T$$

$$= 3802.3 \times (\Delta A + 0.0125) \div W$$

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。

$$\text{GABA-T } (\mu\text{g/h}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.0003) \div 0.0526] \times (V2 \div V3) \div (500 \times V1 \div V) \div T$$

$$= 3802.3 \times (\Delta A + 0.0125) \div 500$$

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：

- 1 标准品母液（5mg/mL）：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）。
- 2 把母液用蒸馏水稀释成以下浓度梯度的标准品：0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 mg/mL。
- 3 按照测定管的③-显色反应阶段的加样体系操作，根据结果即可制作标准曲线。