

γ-氨基丁酸转氨酶（GABA-T）测定试剂盒说明书

（货号：G1103F 分光法 24 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： $4\text{-aminobutanoate} + \text{pyruvate} = \text{succinate semialdehyde} + \text{L-alanine}$

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°C保存	
试剂一	粉体 mg×1 支	4°C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°C保存	临用前甩几下使粉剂落入底部，再加 5mL 试剂三溶解备用。
试剂三	液体 8mL×1 瓶	4°C保存	
试剂四	液体 11mL×1 瓶	4°C保存	
试剂五	A: 液体 13mL×2 瓶 B: 液体 2mL×1 瓶	4°C保存	临用前取 0.9mL 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 支	4°C保存	
标准品	粉体 mg×1 支	4°C保存	若重新做标曲，则用到该试剂。

三、所需的仪器和用品：

可见分光光度计、1mL 玻璃比色皿（光径 1cm）、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°C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°C离心 10min，取上清，置冰上待测。

2、上机检测：

- ① 可见分光光度计预热 30min 以上，调节波长至 645nm，蒸馏水调零。
 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	80	80
试剂一	80	
蒸馏水		80
试剂二	80	80

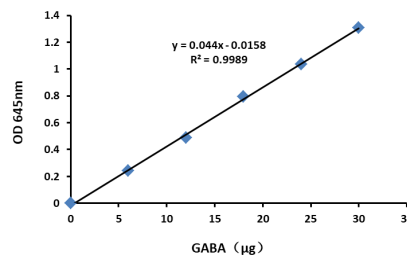
混匀，于 30℃ 孵育 30min		
试剂四	160	160
立即混匀，室温 12000rpm，离心 5min，上清液待测		

③ 显色反应：于 EP 管依次加入：

上清液	100	100
试剂四	60	60
试剂五	400	400
试剂六	200	200
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，取澄清的全部液体转移至 1mL 玻璃比色皿中，于 645nm 处读取各管的 A 值， $\Delta A = A$ 对照 - A 测定(每个样本需做一个自身对照)。		

五、结果计算：

1、标准曲线： $y = 0.044x - 0.0158$ ，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 $1\mu\text{g}$ 的 GABA 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{GABA-T 活力}(\mu\text{g/h/mg prot}) &= [(\Delta A + 0.0158) \div 0.044] \times (V2 \div V3) \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T \\ &= 2272.7 \times (\Delta A + 0.0158) \div \text{Cpr} \end{aligned}$$

3、按样本鲜重计算：

单位定义：每克组织每小时消耗 $1\mu\text{g}$ 的 GABA 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{GABA-T 活力}(\mu\text{g/h/g 鲜重}) &= [(\Delta A + 0.0158) \div 0.044] \times (V2 \div V3) \div (W \times V1 \div V) \div T \\ &= 2272.7 \times (\Delta A + 0.0158) \div W \end{aligned}$$

4、按细菌/细胞数量计算：

单位定义：每 10^4 个细胞每小时消耗 $1\mu\text{g}$ 的 GABA 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{GABA-T 活力}(\mu\text{g/h}/10^4 \text{ cell}) &= [(\Delta A + 0.0158) \div 0.044] \times (V2 \div V3) \div (500 \times V1 \div V) \div T \\ &= 2272.7 \times (\Delta A + 0.0158) \div 500 \end{aligned}$$

V--提取液体积，1mL；V1--加入反应体系中样本体积，0.08mL；W--样本质量，g；500--细胞数量，万；

V2--反应体系总体积：0.4mL；V3--③步上清液的体积，0.1mL；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 把母液稀释成以下浓度梯度的标准品：0, 0.06, 0.12, 0.18, 0.24, 0.3 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