

γ-氨基丁酸转氨酶(GABA-T)测定试剂盒

分光法 24 样

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.

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×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 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×瓶	4℃保存	
试剂五	液体 10mL×1 支	4℃保存	
试剂六	A: 液体 13mL×2 瓶	4℃保存	临用前取 0.9mL 的 B 液进一瓶 A 液中, 混

	B: 液体 2mL×1 瓶		匀后作为试剂六使用。混匀后的试剂六半个月 个月内用完。
标准品	粉体 mg×1 支	4℃保存	若重新做标曲，则用到该试剂。

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。

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:

取约 0.1g 组织，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、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。		
试剂三	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：

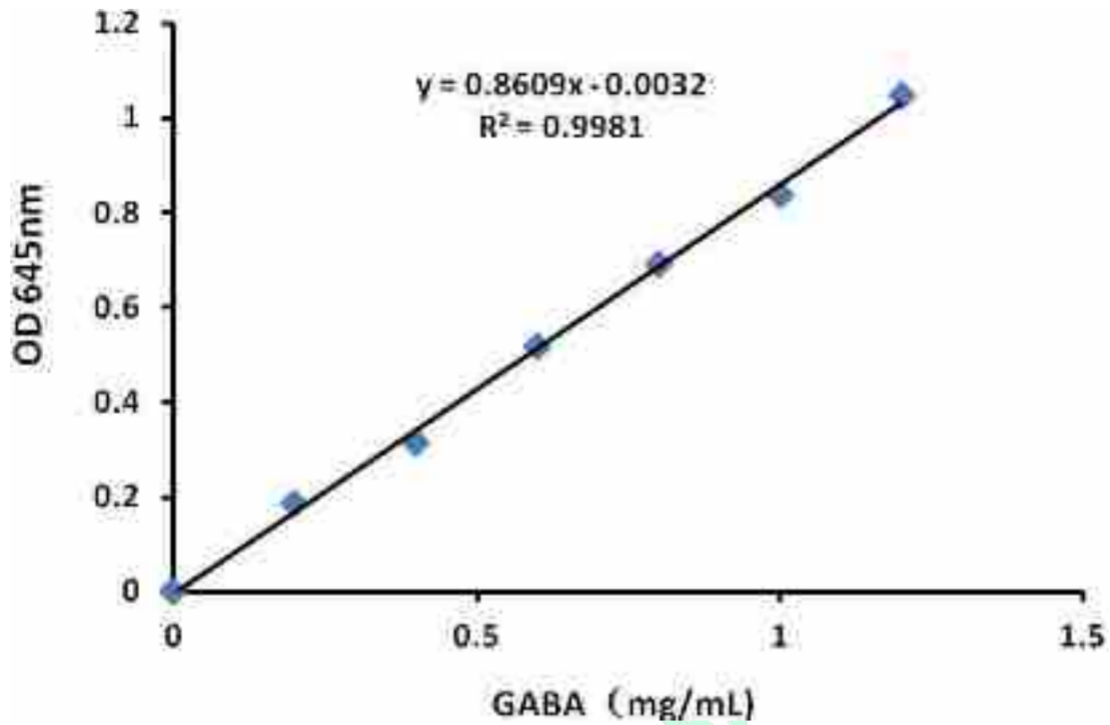
上清液	100	100
试剂四	60	60
试剂五	200	200
试剂六	400	400
混匀，沸水浴（95-100℃）10min，冰浴至室温，呈现蓝绿色颜色，全部液体转移至 1mL 玻璃比色皿中，于 645nm 处读取各管的 A 值， $\Delta A = A_{\text{对照}} - A_{\text{测定}}$ (每个样本需做一个自身对照)。		

[注]：若 ΔA 值在零附近，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 1500 μ L，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。

结果计算：

1、标准曲线：

$y = 0.8609x - 0.0032$ ， x 为标准品浓度(mg/mL)， 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 1mg 的 GABA 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{GABA-T 活力}(\text{mg/h/mg prot}) &= [(\Delta A + 0.0032) \div 0.8609] \times V2 \div (V1 \times Cpr) \div T \\ &= 11.62 \times (\Delta A + 0.0032) \div Cpr \end{aligned}$$

3、按样本鲜重计算：

单位定义：每克组织每小时消耗 1mg 的 GABA 定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{GABA-T 活力}(\text{mg/h/g 鲜重}) &= [(\Delta A + 0.0032) \div 0.8609] \times V2 \div (W \times V1 \div V) \div T \\ &= 11.62 \times (\Delta A + 0.0032) \div W \end{aligned}$$

4、按细菌或细胞密度计算：

单位定义：每 10^4 个细胞每小时消耗 1mg 的 GABA 定义为一个酶活单位。

$$\text{GABA-T 活力}(\text{mg/h}/10^4\text{cell}) = [(\Delta A + 0.0032) \div 0.8609] \times V2 \div (500 \times V1 \div V) \div T$$

$$=0.03 \times (\Delta A + 0.0032) \text{GPP} (\mu\text{mol/h} / 104 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.003) \div 0.6624 \times V2] \div (500 \times V1 \div V)$$

$$\div T = 0.024 \times (\Delta A + 0.003).$$

5、按照液体体积计算:

单位定义: 每毫升液体每小时消耗 1mg 的 GABA 定义为一个酶活力单位。

$$\text{GABA-T 活力} (\text{mg/h/mL}) = [(\Delta A + 0.0032) \div 0.8609] \times V2 \div V1 \div T = 11.62 \times (\Delta A + 0.0032)$$

V---提取液体积, 1mL; V1---加入反应体系中样本体积, 0.08mL;

V2---反应体系总体积: 0.4mL; T---反应时间, 30min=0.5h; W---样本质量, g;

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 (2mg/ml): 标准品临用前加 1mL 蒸馏水溶解。
2. 把母液稀释成以下浓度梯度的标准品: 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1, 1.2 mg/ml。也可根据实际样本来调整标准品浓度。
3. 按照显色反应阶段的测定管加样体系操作, 根据结果即可制作标准曲线。