

GABA 转氨酶(GABA-T)试剂盒

(微板法 48 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×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	液体 10mL×1 瓶	4℃保存	
试剂六	A: 液体 8mL×3 瓶	4℃保存	临用前取 0.55mL 的 B 液进一瓶 A 液中, 混匀后

	B: 液体 2mL×1 支		作为试剂六使用。混匀后的试剂六半个月用完。
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:

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。

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，了解本批样品情况，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，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 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		

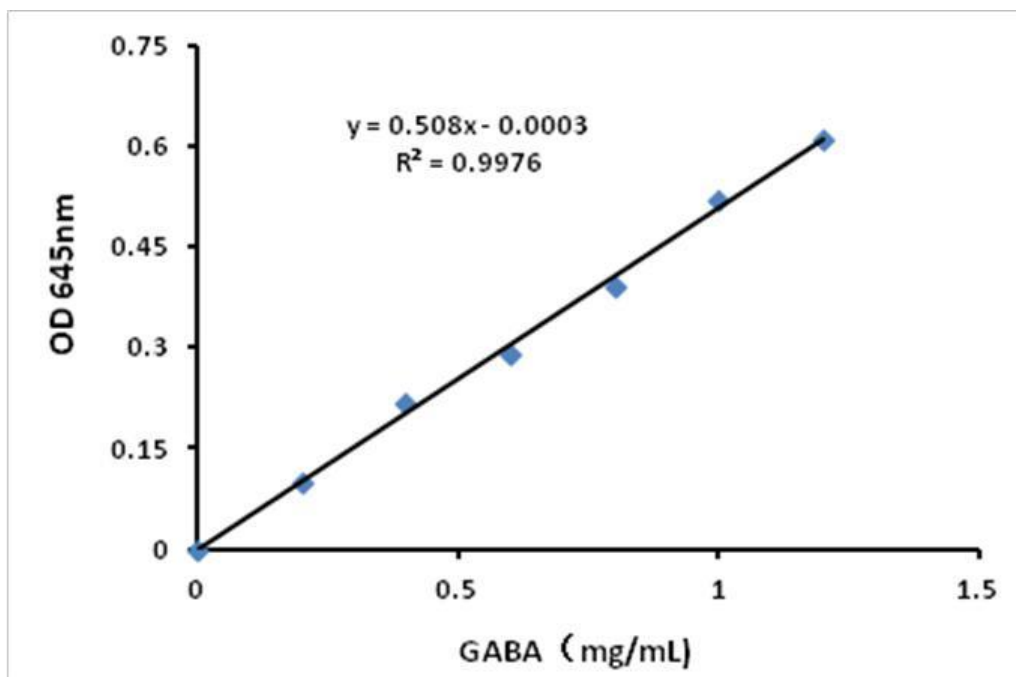
③ 显色反应：于 EP 管中依次加入：

上清液	50	50
试剂四	30	30
试剂五	100	100
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 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 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。

结果计算:

1、标准曲线方程： $y = 0.508x - 0.0003$ ，x 为标准品质量(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。

$$\text{GABA-T (mg/h/mg prot)} = [(\Delta A + 0.0003) \div 0.508] \times V2 \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T = 19.7 \times (\Delta A + 0.0003) \div \text{Cpr}.$$

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。

$$\begin{aligned} \text{GABA-T (mg/h/g 鲜重)} &= [(\Delta A + 0.0003) \div 0.508] \times V2 \div (W \times V1 \div V) \div T \\ &= 19.7 \times (\Delta A + 0.0003) \div W. \end{aligned}$$

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 1mg 的 GABA 定义为一个酶活单位。

$$\begin{aligned} \text{GABA-T (mg/h/10}^4 \text{ cell)} &= [(\Delta A + 0.0003) \div 0.508] \times V2 \div (500 \times V1 \div V) \div T \\ &= 0.04 \times (\Delta A + 0.0003). \end{aligned}$$

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。

$$\text{GABA-T}(\text{mg/h/mL}) = [(\Delta A + 0.0003) \div 0.508] \times V_2 \div V_1 \div T = 19.7 \times (\Delta A + 0.0003)$$

V---提取液体积, 1mL; V1---加入反应体系中样本体积, 0.04mL;

V2---反应体系总体积: 0.2mL; 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。