

胆汁盐水解酶(BSH) 活性测定试剂盒说明书

(微板法48样)

一、产品简介：

胆汁盐水解酶(BSH) 是一种肠道菌群在生长发育中产生的代谢产物。BSH 在胆汁酸代谢及肝肠循环中具有重要作用，BSH 可以调节胆汁酸代谢从而影响宿主的脂质代谢和胆固醇动态平衡，另外可以改善食用动物的生长性能和饲料效率等作用。

BSH 能催化胆汁酸的水解反应，释放出游离氨基化合物。TNBS(2,4,6- 三硝基苯磺酸)与游离氨基反应生成黄色复合物，通过测定420nm 处吸光值，来定量胆汁盐水解酶活性。

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	液体0.6mL×1支	4°C保存	临用前取0.25mL试剂一至一新EP管中，再加入1mL二甲基亚砜(DMSO)，混匀备用(可分装保存，且低温该试剂会凝固，用之前可解冻至溶解状态再使用)。
试剂二	液体45mL×1瓶	4°C保存	
试剂三	A液：液体0.3mL×1支 B液：液体15mL×1瓶	-20°C保存	临用前吸取20μL的试剂三A至一新EP管中，再加入980μL的试剂三B,混匀作为试剂三使用(A液：B液=1:49)(现配现用，避光保存，一周内用完)。
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：

酶标仪、96孔板、水浴锅/恒温培养箱、台式离心机、可调式移液器、研钵、二甲基亚砜(DMSO)。

四、胆汁盐水解酶(BSH) 活性测定：

建议正式实验前选取2个样本做预测定，了解本批样品和实验流程，避免样本和试剂浪费!

1、样本制备：

①组织样本：取约0.1g组织，加入1mL 提取液，进行冰浴匀浆。12000rpm,4°C离心10min, 取上清，置冰上待测。

【注】:若增加样本量，可按照组织质量(g):试剂一体积(mL)为1:5~10的比例提取。

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。

【注】:若增加样本量，可按照细菌或细胞数量(10⁴个):提取液体积(mL)为500~1000:1的比例提取。

③液体样本：直接检测。若浑浊，12000rpm,4°C 离心10min后取上清检测。

2、上机测定：

①可见分光光度计预热30min 以上，调节波长至420nm,。

②孵育阶段：试剂一和二可预先解冻至室温或37°C孵育5-10min。在EP管中依次加入：

试剂名称(μL)	测定管	对照管
上清液	40	40
试剂一	40	
试剂二	320	360
混匀，37°C避光孵育30min。		

本试剂盒仅供科研使用

95°C孵育10min,若有沉淀，25°C×8000rpm离心5min,
取上清液待测。

③显色阶段：在EP管中依次加入：

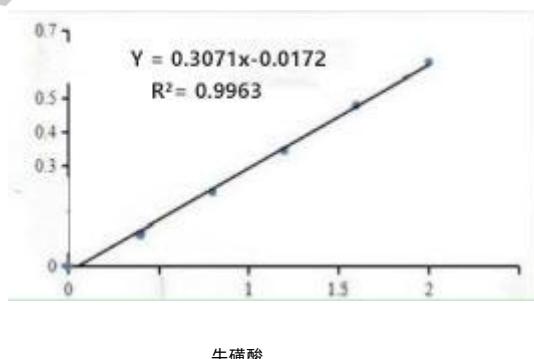
试剂名称(μL)	测定管	对照管
上清液	100	100
试剂三	100	100
混匀，50°C孵育20min,全部液体转移至1mL玻璃比色皿(光径 1cm)中，于420nm处测定吸光值A。 △A=A测定-A对照(每个样本需做一个自身对照)。		

【注】1.若A测定超过1.2,可降低样本量V1(如由40μL降为10μL,则试剂二相应增加),试剂二相应 增加。则改变后的加样体积V1 需代入计算公式重新计算。

2.若△A<0.01,则可增加样本量V1 (如由40μL增为80μL,则试剂二相应减少),或延长孵育时间T (如由30min增至60min),或增加样本取样质量(W), 则改变后的V1和T和W 需代入 计算公式重新计算。

五、结果计算：

1、标准曲线方程： $y=0.3071x-0.0172$,x 为标准品质量(μg);y 是△A。



2、按样本鲜重计算：

酶活定义：每克组织每小时催化产生1μg 牛磺酸所需的酶量定义为一个酶活力单位。

$$\text{BSH}(\mu\text{g}/\text{h/g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.0172) \div 0.3071] \times 4 \div (W \times V1 \div V) \div T = 651.25 \times (\Delta A + 0.0172) \div W$$

3、按细菌或细胞密度计算：

酶活定义：每1万个细菌或细胞每小时催化产生1μg牛磺酸所需酶量定为一个酶活力单位。

$$\text{BSH}(\mu\text{g}/\text{h}/10^4\text{cell}) = [(\Delta A + 0.0172) \div 0.3071] \times 4 \div (500 \times V1 \div V) \div T = 1.31 \times (\Delta A + 0.0172)$$

4、按液体体积计算：

酶活定义：每毫升血清(浆)每小时催化产生1μg 牛磺酸所需酶量定义为一个酶活力单位。

$$\text{BSH}(\mu\text{g}/\text{h}/\text{mL}) = [(\Delta A + 0.0172) \div 0.3071] \times 4 \div V1 \div T = 651.25 \times (\Delta A + 0.0172)$$

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

T---反应时间， 30min=0.5h; W---样本质量， g;

4---孵育阶段总反应液体积与显色阶段上清液体积的比值；

500----细胞或细菌总数， 万; Mr--- 标准品分子量， 125.15。

附：标准曲线制作过程：

1 制备标准品母液：向标准品管中加2mL 蒸馏水溶解标准品，充分混匀，得到标准品溶液 (2mg/mL)， 蒸馏水稀释100倍得到标准品母液(20μg/mL)。

2 把母液稀释成以下浓度： 0,4,8,12,16,20μg/mL 。也可根据实际来调整浓度。

3 在96孔板中加入： 100μL 标准品+100μL 试剂三，混匀，于50°C孵育20min; 于420nm 处测定吸光值A, 依据结果即可制作标准曲线。