

胆汁盐水解酶（BSH）活性测定试剂盒说明书

（货号：G0933F 分光法 24 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 30mL×1 瓶	4℃保存	
试剂一	液体 0.6mL×1 支	4℃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℃保存	
试剂三	A 液：液体 0.5mL×1 支 B 液：液体 30mL×1 瓶	-20℃保存	临用前吸取 0.1mL 的试剂三 A 至一新 EP 管中，再加入 4.9mL 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℃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/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℃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℃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(10^4 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℃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，蒸馏水调零。

② 孵育阶段：试剂一和二可预先解冻至室温或 37℃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	80	80
试剂一	60	
试剂二	500	560
混匀，37℃避光孵育 30min。		

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

③ 显色阶段: 在 EP 管中依次加入:

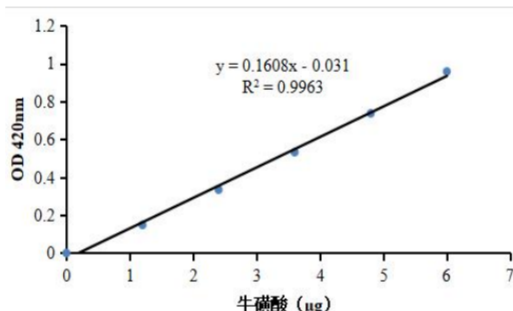
试剂名称 (μL)	测定管	对照管
上清液	300	300
试剂三	400	400
混匀, 50℃孵育 20min, 全部液体转移至 1mL 玻璃比色皿 (光径 1cm) 中, 于 420nm 处测定吸光值 A。 $\Delta A = A_{\text{测定}} - A_{\text{对照}}$ (每个样本需做一个自身对照)。		

【注】1. 若 A 测定超过 1.5, 可降低样本量 V1 (如由 80μL 降为 40μL, 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 $\Delta A < 0.01$, 则可增加样本量 V1 (如由 80μL 增为 150μL, 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: $y = 0.1608x - 0.031$, x 为标准品质量 (μg); y 是 ΔA 。



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。

$$BSH(\mu\text{g/h/g 鲜重}) = [(\Delta A + 0.031) \div 0.1608] \times 2.13 \div (W \times V1 \div V) \div T = 331.16 \times (\Delta A + 0.031) \div W$$

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。

$$BSH(\mu\text{g/h}/10^4 \text{ cell}) = [(\Delta A + 0.0172) \div 0.1608] \times 2.13 \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.66 \times (\Delta A + 0.031)$$

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。

$$BSH(\mu\text{g/h/mL}) = [(\Delta A + 0.0172) \div 0.1608] \times 2.13 \div V1 \div T = 331.16 \times (\Delta A + 0.031)$$

V---提取液体积, 1mL;

V1---反应体系中样本体积, 0.08mL;

T---反应时间, 30min=0.5h;

W---样本质量, g;

2.13---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 EP 管中加入: 300μL 标准品+400μL 试剂三, 混匀, 于 50℃孵育 20min; 依据结果即可制作标准曲线。