

## 胆汁盐水解酶（BSH）活性测定试剂盒说明书

（货号：G0933W 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 二甲基亚砷（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、二甲基亚砷（DMSO）。

### 四、胆汁盐水解酶（BSH）活性测定活性测定：

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( $10^4$ 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°C 离心 10min 后取上清检测。

#### 2、上机测定：

① 酶标仪预热 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。		
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 96 孔板中依次加入：

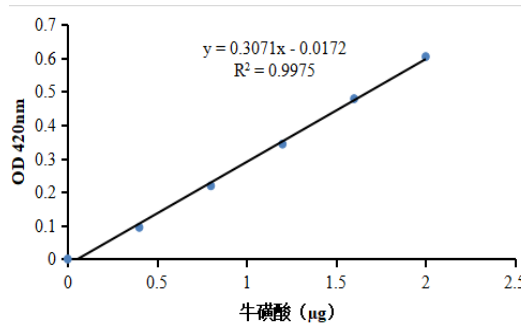
试剂名称 (μL)	测定管	对照管
上清液	100	100
试剂三	100	100

混匀，50°C 孵育 20min，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)。

## 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  $\Delta A$ 。



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。

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

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。