

胆汁盐水解酶(BSH) 活性测定试剂盒说明书

(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°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0.5mL×1支 B液:液体30mL×1瓶	-20°C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°C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°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℃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。		

本试剂盒仅供科研使用

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：

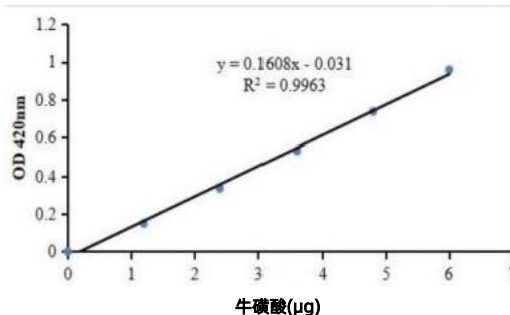
试剂名称(μL)	测定管	对照管
上清液	300	300
试剂三	400	400
混匀，50℃孵育20min,全部液体转移至1mL玻璃比色皿(光径1cm)中，于420nm处测定吸光值A。 △A=A测定-A对照(每个样本需做一个自身对照)。		

【注】1.若A测定超过1.5,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1 μg 牛磺酸所需的酶量定义为一个酶活力单位。

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

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1 μg 牛磺酸所需酶量定义为一个酶活力单位。

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

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1 μg 牛磺酸所需酶量定义为一个酶活力单位。

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

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。