

琥珀酸脱氢酶（Succinate Dehydrogenase, SDH）试剂盒说明书

微量法 100管/96样

正式测定前务必取2-3个预期差异较大的样本做预测定

测定意义：

SDH (EC 1.3.5.1) 广泛存在于动物、植物、微生物和培养细胞中。SDH是线粒体的一种**标志酶**，位于**线粒体内膜**上的一种膜结合酶，是连接呼吸电子传递和氧化磷酸化的枢纽之一。此外，为多种原核细胞产能的**呼吸链**提供电子。

测定原理：

SDH催化琥珀酸脱氢生成延胡索酸，脱下的氢通过吩嗪二甲酯硫酸（PMS）传递还原2,6-二氯酚靛酚（DCPIP），并且在600nm处具有特征吸收峰，通过600nm吸光度的变化，测定2, 6-DPIP的还原速度，代表SDH酶活性。

自备实验用品及仪器：

可见分光光度计/酶标仪、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、微量石英比色皿/96孔板、研钵、冰和蒸馏水。

试剂的组成和配制

试剂一：100mL×1瓶，-20℃保存；

试剂二：20mL×1瓶，-20℃保存；

试剂三：1.5mL×1支，-20℃保存；

试剂四：粉剂×1瓶，4℃保存；

试剂五：粉剂×1支，-20℃保存；

样本的前处理

组织、细菌或细胞中胞浆蛋白与线粒体蛋白的分离：

- 1、称取约0.1g组织或收集500万细胞，加入1mL试剂一和10uL 试剂三，用冰浴匀浆器或研钵匀浆。
- 2、将匀浆600g，4℃离心5min。
- 3、弃沉淀，将上清液移至另一离心管中，11000g，4℃离心10min。
- 4、上清液即胞浆提取物，可用于测定从线粒体泄漏的SDH（此步可选做）。
- 5、在步骤④的沉淀中加入200uL试剂二和2uL 试剂三，超声波破碎（冰浴，功率20%或200W，超声3秒，间隔10秒，重复30次），用于线粒体SDH活性测定。

测定步骤和加样表

1、分光光度计或酶标仪预热30min以上，调节波长至600nm，蒸馏水调零。

2、样本测定

（1）在试剂四中加入18mL蒸馏水充分溶解，置于37℃（哺乳动物）或25℃（其它物种）水浴10min；用不完的试剂分装后-20℃保存，禁止反复冻融；

（2）在试剂五中加入1mL蒸馏水，充分溶解待用；用不完的试剂分装后-20℃保存，禁止反复冻融；

（3）在微量石英比色皿或96孔板中加入10μL样本、10μL试剂五和180μL试剂四，混匀，立即记录600nm处20s时的吸光值A1和 1min20s后的

吸光值A2, 计算 $\Delta A=A_1-A_2$ 。

琥珀酸脱氢酶 (Succinate Dehydrogenase, SDH) 试剂盒说明书活性的计算

a.用微量石英比色皿测定的计算公式如下

(1) 按样本蛋白浓度计算

单位的定义: 每mg组织蛋白每分钟消耗1 nmol 2,6-二氯酚靛酚定义为一个酶活性单位。

$$\text{SDH活性 (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T = 952 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

(2) 按样本鲜重计算

单位的定义: 每g组织每分钟消耗1 nmol 2,6-二氯酚靛酚定义为一个酶活性单位。

$$\text{SDH活性 (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 192 \times \Delta A \div W$$

(3) 按细菌或细胞密度计算

单位的定义: 每1万个细菌或细胞每分钟消耗1 nmol 2,6-二氯酚靛酚定义为一个酶活性单位。

$$\text{SDH活性 (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.385 \times \Delta A$$

V反总: 反应体系总体积, 2×10^{-4} L; ϵ : 2,6-二氯酚靛酚摩尔消光系数, 2.1×10^4 L/mol/cm; d: 比色皿光径, 1cm; V样: 加入样本体积, 0.01 mL; V样总: 加入提取液体积, 0.202 mL; T: 反应时间, 1 min; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; W: 样本质量, g; 500: 细菌或细胞总数, 500万。

b.用96孔板测定的计算公式如下

(1) 按样本蛋白浓度计算

单位的定义: 每mg组织蛋白每分钟消耗1 nmol 2,6-二氯酚靛酚定义为一个酶活性单位。

$$\text{SDH活性 (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 1904 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

(2) 按样本鲜重计算

单位的定义: 每g组织每分钟消耗1 nmol 2,6-二氯酚靛酚定义为一个酶活性单位。

$$\text{SDH活性 (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 384 \times \Delta A \div W$$

(3) 按细菌或细胞密度计算

单位的定义: 每1万个细菌或细胞每分钟消耗1 nmol 2,6-二氯酚靛酚定义为一个酶活性单位。

$$\text{SDH活性 (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.77 \times \Delta A$$

V反总: 反应体系总体积, 2×10^{-4} L; ϵ : 2,6-二氯酚靛酚摩尔消光系数, 2.1×10^4 L/mol/cm; d: 96孔板光径, 0.5cm; V样: 加入样本体积, 0.01 mL; V样总: 加入提取液体积, 0.202 mL; T: 反应时间, 1 min; Cpr: 样本蛋白质浓度, mg/mL; W: 样本质量, g; 500: 细菌或细胞总数, 500万。