

## 琥珀酸脱氢酶 (SDH) 活性检测试剂盒说明书

微量法

**注意：本产品试剂有所变动，请注意并严格按照该说明书操作。**

货号：BC0955

规格：100T/96S

**产品组成：使用前请认真核对试剂体积与瓶内体积是否一致，有疑问请及时联系索莱宝工作人员。**

试剂名称	规格	保存条件
试剂一	液体 110 mL×1 瓶	-20°C保存
试剂二	液体 0.6mL×2 支	-20°C保存
试剂三	液体 18 mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂四	液体 3mL×1 瓶	2-8°C保存
试剂五	液体 3mL×1 瓶	2-8°C保存

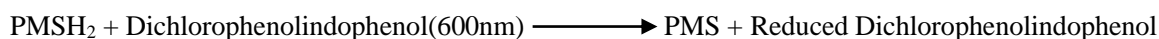
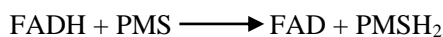
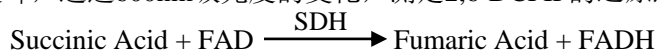
溶液的配制：

- 1、试剂二：为易挥发试剂，用完后尽快密封，-20°C保存；

### 产品说明：

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。

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-DCPIP的还原速度，代表SDH酶活性。



**注意：实验之前建议选择 2-3 个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。**

### 需自备的仪器和用品：

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

### 操作步骤：

#### 一、样本处理（可适当调整待测样本量，具体比例可以参考文献）

1. 组织样本：称取约 0.1g 组织，加入 1mL 试剂一和 10μL 试剂二，用冰浴匀浆器或研钵匀浆充分研磨，4°C 11000g 离心 10min，取上清，置冰上待测。
2. 细胞或者细菌样本：先收集 500 万细菌/细胞到离心管内，离心后弃上清；之后加入 1mL 试剂一和 10μL 试剂二，冰浴超声波破碎细菌（功率 200W，超声 3s，间隔 7s，总时间 5min）；然后 11000g，4°C，离心 10 min，取上清置于冰上待测。

## 二、测定步骤

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

2、样本测定

试剂名称 (μL)	测定管	空白管
试剂三	170	170
试剂四	10	10
37°C(哺乳动物)或25°C (其它物种) 保温10min左右		
样本	10	
蒸馏水		10
试剂五	10	10

将试剂三和试剂四依次加入到 1.5mLEP 管中，37°C(哺乳动物)或 25°C (其它物种) 保温 10min 后加入到微量比色皿或 96 孔板再按表格依次加入各试剂，在 600nm 波长下记录 20s 时的初始吸光度 A1 和 1min20s 时的吸光度 A2，计算  $\Delta A = A1 - A2$ ，得到  $\Delta A$  测定、 $\Delta A$  空白。空白管只需测 1-2 次。

## 三、SDH 活性的计算

a.用微量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组织蛋白在反应体系中每分钟消耗1nmol 2,6-二氯酚靛酚定义为一个酶活性单位。

$$\begin{aligned} \text{SDH活性 (U/mg prot)} &= [(\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9] \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T \\ &= 952.381 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div C_{\text{pr}} \end{aligned}$$

(2) 按样本质量计算

单位的定义：每g组织在反应体系中每分钟消耗1nmol 2,6-二氯酚靛酚定义为一个酶活性单位。

$$\begin{aligned} \text{SDH活性 (U/g 质量)} &= [(\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T \\ &= 961.905 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div W \end{aligned}$$

(3) 按细菌或细胞数量计算

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

$$\begin{aligned} \text{SDH活性 (U/10}^4 \text{ cell)} &= [(\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times 500) \div T \\ &= 1.924 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \end{aligned}$$

V反总：反应体系总体积， $2 \times 10^{-4}$ L； $\epsilon$ ：2,6-二氯吡啶酚摩尔消光系数， $2.1 \times 10^4$ L/mol/cm；d：比色皿光径，1cm；V样：加入样本体积，0.01mL；V样总：加入试剂一和试剂二体积，1.01mL；T：反应时间，1min；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； $10^9$ ：单位换算系数， $1 \text{mol} = 10^9 \text{nmol}$ 。

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组织蛋白在反应体系中每分钟消耗1nmol 2,6-二氯酚靛酚定义为一个酶活性单位。

$$\begin{aligned} \text{SDH活性 (U/mg prot)} &= [(\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9] \div (C_{\text{pr}} \times V_{\text{样}}) \div T \\ &= 1587.302 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div C_{\text{pr}} \end{aligned}$$

(2) 按样本质量计算

单位的定义：每g组织在反应体系中每分钟消耗1nmol 2,6-二氯酚靛酚定义为一个酶活性单位。

$$\begin{aligned} \text{SDH活性 (U/g 质量)} &= [(\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T \\ &= 1603.175 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div W \end{aligned}$$

### (3) 按细菌或细胞数量计算

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

$$\text{SDH活性 (U/10}^4 \text{ cell)} = [(\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times 500) \div T \\ = 3.207 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}})$$

V反总：反应体系总体积， $2 \times 10^{-4} \text{L}$ ； $\epsilon$ ：2,6-二氯吲哚酚摩尔消光系数， $2.1 \times 10^4 \text{L/mol/cm}$ ；d：96孔板光径，0.6cm；  
V样：加入样本体积，0.01mL；V样总：加入试剂一和试剂二体积，1.01mL；T：反应时间，1min；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； $10^9$ ：单位换算系数， $1 \text{mol} = 10^9 \text{nmol}$ 。

#### 注意事项：

- 1、测定过程中所有试剂和样本在冰上放置，以免变性失活。
- 2、若 $\Delta A$ 大于0.5（比色皿）/0.3（96孔板），需将酶液用酶提取液稀释，使 $\Delta A$ 小于0.5/0.3，可提高检测灵敏度。注意同步修改计算公式。
- 3、由于提取液中含有一定浓度的蛋白（约1mg/mL），所以在测定样品蛋白浓度时需要减去提取液本身的蛋白含量。

#### 实验实例：

- 1、取0.1g肾脏加入1mL试剂一和10 $\mu\text{L}$ 试剂二，用冰浴匀浆器匀浆充分研磨，4 $^{\circ}\text{C}$  11000g离心10min，取上清置冰上。按照测定步骤操作，用微量石英比色皿测得计算 $\Delta A_{\text{测定}} = A1_{\text{测定}} - A2_{\text{测定}} = 0.7838 - 0.6414 = 0.1424$ ， $\Delta A_{\text{空白}} = A1_{\text{空白}} - A2_{\text{空白}} = 1.019 - 1.019 = 0$ ，按样本质量计算酶活得：

$$\text{SDH活性 (U/g 质量)} = 961.905 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div W = 1369.75 \text{ U/g 质量。}$$

#### 参考文献：

[1] Fattoretti P, Bertoni-Freddari C, Caselli U, et al. Impaired succinic dehydrogenase activity of rat Purkinje cell mitochondria during aging[J]. Mechanisms of ageing and development, 1998, 101(1-2): 175-182.

#### 相关系列产品：

- BC0710/BC0715  $\alpha$ -酮戊二酸脱氢酶（ $\alpha$ -KGDH）活性检测试剂盒
- BC2150/BC2155 柠檬酸（CA）含量检测试剂盒
- BC0380/BC0385 丙酮酸脱氢酶（PDH）活性检测试剂盒

