

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

(微板法 96 样)

一、产品简介:

琥珀酸脱氢酶 (SDH, EC 1.3.5.1) 广泛存在于动物、植物、微生物和培养细胞中。在真核生物中, 结合于线粒体内膜, 在原核生物中整合于细胞膜上, 是连接呼吸电子传递和氧化磷酸化的枢纽之一。

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 吸光度值的变化得出 SDH 酶活性大小。

二、试剂盒的组成和配制:

试剂名称	规格	保存要求	备注
试剂一	液体 120mL×1 瓶	-20°C保存	
试剂二	液体 120mL×1 瓶	-20°C保存	
试剂三	液体 0.5mL×1 支	-20°C保存	
试剂四	粉体 mg×1 瓶	4°C保存	临用前甩几下使粉剂落入底部, 再加 20mL 蒸馏水溶解 (观察液体为蓝色), 可分装保存。
试剂五	粉剂×4 支	-20°C避光保存	临用前甩几下使粉剂落入底部, 再加 0.4mL 蒸馏水溶解, 现配现用, 两天内用完。

三、所需的仪器和用品:

酶标仪、96 孔板、可调式移液器、低温离心机、研钵。

四、琥珀酸脱氢酶(SDH)活性测定:

建议正式实验前选取 2 个样本做预测定, 了解本批样品情况, 熟悉实验流程, 避免实验样本和试剂浪费!

1.1 线粒体制备 (提示: 整个线粒体的提取过程须保持 4°C低温环境):

- ① 称取约 0.1g 组织或收集 500 万细胞, 加入 1mL 试剂一, 用冰浴匀浆器或研钵匀浆, 转移至离心管后于 4°C×700g 离心 10min。
- ② 弃沉淀, 上清液移至另一离心管中, 4°C×12000g 离心 10min。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), 沉淀为线粒体。
- ③ 在沉淀 (线粒体) 中加入 200 μ L 试剂二和 2 μ L 试剂三, 超声波破碎 (冰浴, 功率 20% 或 200W, 超声 3s, 间隔 10 秒, 重复 30 次), 液体置于冰上用于线粒体中琥珀酸脱氢酶 (SDH) 活性测定。

【注】: 若增加样本量, 可按照组织质量 (g): 提取液体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例进行提取, 或按照细胞数量 (10^4): 提取液 (mL) 为 500~1000: 1 的比例进行提取。

1.2 原核生物 (细菌) 样本制备:

先收集细菌到离心管内, 离心后弃上清; 取约 500 万细菌加入 1mL 试剂二, 超声波破碎细菌 (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/细胞数量 (10^4): 提取液 (mL) 为 500~1000: 1 的比例进行提取。

2、上机检测:

- ① 酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 600nm。
- ② 所有试剂解冻至室温 (25°C)。

③ 在 96 孔板中依次加入：

试剂名称 (μL)	测定管
试剂四	180
试剂五	10
样本	50
混匀，室温 (25°C) 下，10s 时立即于 600nm 处读取 A1，5min 后读取 A2， $\Delta A=A1-A2$ 。	

【注】若 ΔA 差值较小，可以延长反应时间 T (如增至 15min 或更长)，或加大样本量 V1 (如增至 70μL)，则改变后的反应时间 T 和样本体积 V1 代入计算公式重新计算。

五、结果计算：

1、线粒体制备样本的计算公式：

① 按样本蛋白浓度计算：

酶活定义：每毫克组织蛋白每分钟使 A600 变化 0.005 定义为一个酶活性单位。

$$\text{SDH 活性 (U/mg prot)} = \Delta A \div 0.005 \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T = 800 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

② 按样本鲜重计算：

酶活定义：每克组织每分钟使 A600 变化 0.005 定义为一个酶活性单位。

$$\text{SDH 活性 (U/g 鲜重)} = \Delta A \div 0.005 \div (W \times V1 \div V) \div T = 161.6 \times \Delta A \div W$$

④ 按细胞数量计算：

酶活定义：每 1 万个细胞每分钟使 A600 变化 0.005 定义为一个酶活性单位。

$$\text{SDH 活性 (U/10}^4 \text{ cell)} = \Delta A \div 0.005 \div (500 \times V1 \div V) \div T = 0.323 \times \Delta A$$

2、原核生物（细菌）样本的计算公式：

① 按样本蛋白浓度计算：

酶活定义：每毫克组织蛋白每分钟使 A600 变化 0.005 定义为一个酶活性单位。

$$\text{SDH 活性 (U/mg prot)} = \Delta A \div 0.005 \div (V1 \times \text{Cpr}) \div T = 800 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

② 按细菌数量计算：

酶活定义：每 1 万个细菌每分钟使 A600 变化 0.005 定义为一个酶活性单位。

$$\text{SDH 活性 (U/10}^4 \text{ cell)} = \Delta A \div 0.005 \div (500 \times V1 \div V2) \div T = 1.6 \times \Delta A$$

V1---加入样本体积，0.05 mL；

V---加入提取液体积，0.202 mL；

V2---细菌的提取液体积，1mL；

T---反应时间，5 min；

W---样本质量，g；

500---细菌或细胞总数，万；

Cpr---样本蛋白质浓度，mg/mL，建议使用本公司的 BCA 蛋白含量检测试剂盒。