北京沃凯生物科技有限公司
全国免费电话:400-819-385
www.bjoka-vip.com
Tel:010-62971590. Fax:62340519
M-ail:postmaster@oka-vip.com

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：D17125

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，有疑问请及时联系我们工作人员。

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

$$\text{Succinic Acid} + \text{FAD} \xrightarrow{\text{SDH}} \text{Fumaric Acid} + \text{FADH}$$

$$\text{FADH} + \text{PMS} \longrightarrow \text{FAD} + \text{PMSH}_2$$

$$\text{PMSH}_2 + \text{Dichlorophenolindophenol(600nm)} \longrightarrow \text{PMS} + \text{Reduced Dichlorophenolindophenol}$$

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℃ 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℃，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℃(哺乳动物)或25℃（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℃(哺乳动物)或 25℃（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 ΔA=A1-A2，得到 ΔA 测定、ΔA 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。

SDH活性（U/mg prot）=[（ΔA测定-ΔA空白）÷（ε×d）×V反总×10^9]÷(Cpr×V样) ÷T

=952.381×（ΔA测定-ΔA空白）÷Cpr

（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。

SDH活性（U/g 质量）=[（ΔA测定-ΔA空白）÷（ε×d）×V反总×10^9]÷(V样÷V样总×W) ÷T

=961.905×（ΔA测定-ΔA空白）÷W

（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。

SDH活性（U/10^4 cell）=[（ΔA测定-ΔA空白）÷（ε×d）×V反总×10^9]÷(V样÷V样总×500) ÷T

=1.924×（ΔA测定-ΔA空白）

V反总：反应体系总体积，2×10^{-4}L；ε：2,6-二氯吲哚酚摩尔消光系数，2.1×10^4L/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，1mol=10^9nmol。

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。

SDH活性（U/mg prot）=[（ΔA测定-ΔA空白）÷（ε×d）×V反总×10^9]÷(Cpr×V样) ÷T

=1587.302×（ΔA测定-ΔA空白）÷Cpr

（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。

SDH活性（U/g 质量）=[（ΔA测定-ΔA空白）÷（ε×d）×V反总×10^9]÷(V样÷V样总×W) ÷T

=1603.175×（ΔA测定-ΔA空白）÷W

（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。

SDH活性（U/10^4 cell）=[（ΔA测定-ΔA空白）÷(ε×d)×V反总×10^9]÷(V样÷V样总×500)÷T

=3.207×（ΔA测定-ΔA空白）

V反总：反应体系总体积，2×10^{-4}L；ε：2,6-二氯吲哚酚摩尔消光系数，2.1×10^4L/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，1mol=10^9nmol。

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ΔA大于0.5（比色皿）/0.3（96孔板），需将酶液用酶提取液稀释，使ΔA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 10μL 试剂二，用冰浴匀浆器匀浆充分研磨，4℃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 ΔA 测定=A1 测定-A2 测定=0.7838-0.6414=0.1424，ΔA 空白=A1 空白-A2 空白=1.019-1.019=0，按样本质量计算酶活得：

SDH 活性（U/g 质量）=961.905×（ΔA 测定-ΔA 空白）÷W=1369.75 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.