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。

组成：

产品名称	KC005-100T/96S	Storage
试剂一：液体	100ml	-20℃
试剂二：液体	20ml	-20℃
试剂三：液体	1.5ml	-20℃
试剂四：粉剂	1 瓶	4℃
试剂五：粉剂	1 支	-20℃
说明书	一份	

自备仪器和用品：

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

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 10μl 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 200μl 试剂二和 2μl 试剂三，超声波破碎（冰浴，功率 20%或 200W，超声 3 秒，间

最终解释权所有 © 伊势久（江苏连云港）生物科技有限责任公司，保留一切权利

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ΔA=A1-A2。

SDH 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。
SDH 活性（nmol/min /mg prot） = [ΔA×V 反总÷（ε×d）×10^9]÷(Cpr×V 样) ÷T=952×ΔA÷Cpr
（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。
SDH 活性（nmol/min/g 鲜重） = [ΔA×V 反总÷（ε×d）×10^9]÷(W× V 样÷V 样总) ÷T=192×ΔA÷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。
SDH 活性（nmol/min/10^4 cell） = [ΔA×V 反总÷（ε×d）×10^9]÷(500×V 样÷V 样总)÷T=0.385×ΔA
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，2.1×10^4 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。
SDH 活性（nmol/min/mg prot） = [ΔA×V 反总÷（ε×d）×10^9]÷(V 样×Cpr) ÷T=1904×ΔA÷Cpr
（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。
SDH 活性（nmol/min/g 鲜重） = [ΔA×V 反总÷（ε×d）×10^9]÷(W× V 样÷V 样总)÷T=384×ΔA÷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。
SDH 活性（nmol/min/10^4 cell） = [ΔA×V 反总÷（ε×d）×10^9]÷(500×V 样÷V 样总)÷T=0.77×ΔA
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，2.1×10^4 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。

最终解释权所有 © 伊势久（江苏连云港）生物科技有限责任公司，保留一切权利