

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

分光光度法 50 管/48 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	KC006-50T/48S	Storage
试剂一: 液体	50ml	-20°C
试剂二: 液体	10ml	-20°C
试剂三: 液体	1ml	-20°C
试剂四: 液体	5ml	4°C
试剂五: 粉剂	1 支	4°C
试剂六: 粉剂	1 支	-20°C
说明书	一份	

试剂五: 粉剂×1 支, 4°C 保存, 临用前加入 2ml 蒸馏水, 用不完的试剂仍 4°C 保存;

试剂六: 粉剂×1 支, -20°C 保存; 临用前加入 2ml 蒸馏水, 用不完的试剂 4°C 保存。

### 自备仪器和用品:

可见分光光度计、水浴锅、台式离心机、可调式移液器、1 ml 玻璃比色皿、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 万细菌或细胞, 加入 1ml 试剂一和 10 $\mu$ l 试剂三, 用冰浴匀浆器或研钵匀浆。

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



2、将匀浆 600g, 4°C离心 5min。

3、弃沉淀, 将上清液移至另一离心管中, 11000g, 4°C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)。

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:

试剂名称 (μl)	测定管
试剂四	60
试剂五	30
蒸馏水	800

37°C(哺乳动物)或 25°C (其它物种) 保温 10min 左右

样本	30
试剂六	30

用蒸馏水调零后, 依次加各试剂到 1 ml 玻璃比色皿中, 在加入试剂六的同时开始计时, 混匀, 在 600 nm 波长下记录 20 秒时的初始吸光度 A1 和 1 分 20 秒时的吸光度 A2, 计算 $\Delta A=A_1-A_2$ 。

### SDH 活性的计算:

(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。

$$\text{SDH 活性 (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (\text{Cpr} \times V_{\text{样}}) \div T = 1508 \times \Delta A \div \text{Cpr}$$

(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。

$$\text{SDH 活性 (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 304.6 \times \Delta A \div W$$

(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。

$$\text{SDH 活性 (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 0.609 \times \Delta A$$

V 反总: 反应体系总体积,  $9.5 \times 10^{-4}$  L;  $\epsilon$ : 2,6-二氯酚靛酚摩尔消光系数,  $2.1 \times 10^4$  L / mol / cm; d: 比色皿光径, 1cm; V 样: 加入样本体积, 0.03 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。

