

上海茁彩生物科技有限公司  
ZCIBIO Technology Co., Ltd



生化检测原理示意图

Cat. NO: ZC-S0663

Size: 50T/48S

## 琥珀酸脱氢酶 (SDH) 检测试剂盒说明书

### 可见分光光度法

\*正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

#### 一、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。

#### 二、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。

#### 三、需自备的仪器和用品:

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。

#### 四、试剂的组成和配置：

| 种类  | 试剂规格         | 储存条件    | 使用方法及注意事项                   |
|-----|--------------|---------|-----------------------------|
| 试剂一 | 50mL × 1 瓶   | -20℃ 保存 |                             |
| 试剂二 | 10mL × 1 瓶   | -20℃ 保存 |                             |
| 试剂三 | 1mL × 1 支    | -20℃ 保存 |                             |
| 试剂四 | 液体 5mL × 1 瓶 | 4℃ 保存   |                             |
| 试剂五 | 粉剂 × 1 支     | 4℃ 保存   | 临用前加入 2mL 蒸馏水，用不完的试剂仍 4℃ 保存 |
| 试剂六 | 粉剂 × 1 支     | -20℃ 保存 | 临用前加入 2mL 蒸馏水，用不完的试剂 4℃ 保存。 |

#### 五、操作步骤：

##### ● 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10uL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）。在步骤④的沉淀中加入200uL试剂二和2uL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  $\Delta A = A1 - A2$ 。

## 六、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。

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

### (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。

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

$$= 304.6 \times \Delta A \div W$$

### (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。

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

$$= 0.609 \times \Delta A$$

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, 0.03 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。