

组织及血液琥珀酸脱氢酶（SDH）活性检测试剂盒说明书

产品货号	产品名称	包装规格	测定方法
AMHC4-C48	组织及血液琥珀酸脱氢酶（SDH）试剂盒	48T	常量法

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。

试剂组成:

试剂名称	规格	保存条件
试剂一	液体 60 mL×1 瓶	-20℃ 保存
试剂二	液体 0.6 mL×1 支	-20℃ 保存
试剂三	液体 5 mL×1 瓶	2-8℃ 保存
试剂四	液体 4mL×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

操作步骤:

一、样本处理

1. 组织样本：称取约 0.1g 组织，加入 1mL 试剂一和 10 μ L 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 10 μ L 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、分光光度计预热30min以上，调节波长至600nm，蒸馏水调零。
- 2、样本测定:

试剂名称 (μ L)	测定管	空白管
试剂三	60	60
试剂四	60	60
蒸馏水	800	800
37℃(哺乳动物)或25℃（其它物种）保温10min左右		
样本	30	

蒸馏水		30
试剂五	30	30

依次加各试剂到 1mL 玻璃比色皿中，在加入试剂五的同时开始计时；在 600nm 波长下记录 20s 时的初始吸光度 A1，准确反应 1min，记录 1min20s 时的吸光度 A2，计算 $\Delta A = A1 - A2$ ，得到 ΔA 测定、 ΔA 空白。空白管只需测 1-2 次。

样本量过大时，可以根据样本量按比例将试剂三、试剂四、蒸馏水配制成工作液，使工作液一直保持 37℃ 或 25℃ 即可。

三、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。

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

$$= 1555.556 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div C_{\text{pr}}$$

(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。

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

$$= 1571.111 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div W$$

(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。

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

$$= 3.142 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}})$$

V反总：反应体系总体积， $0.98 \times 10^{-3} \text{L}$ ； ϵ ：2,6-二氯吲哚酚摩尔消光系数， $21 \times 10^3 \text{L/mol/cm}$ ；d：比色皿光径，1cm；V样：加入样本体积，0.03mL；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， $1 \text{mol} = 10^9 \text{nmol}$ 。

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，需将酶液用酶提取液稀释，使 ΔA 小于0.5，可提高检测灵敏度。计算公式中乘以稀释倍数。
- 3、由于提取液中含有一定浓度的蛋白（约1mg/mL），所以测定样品蛋白浓度时需要减去提取液本身的蛋白含量。