

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-M96	组织及血液琥珀酸脱氢酶（SDH）试剂盒	96T	微量法

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 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

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 (μ L)	测定管	空白管
-----------------	-----	-----

试剂三	170	170
试剂四	10	10
37°C(哺乳动物)或25°C(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°C(哺乳动物)或25°C(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 $\Delta A=A1-A2$, 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。

$$\text{SDH活性 (U/mg prot)} = [(\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9] \div (\text{Cpr} \times V_{\text{样}}) \div T \\ = 952.381 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div \text{Cpr}$$

(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。

$$\text{SDH活性 (U/g 质量)} = [(\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \\ \div T = 961.905 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div W$$

(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。

$$\text{SDH活性 (U/10}^4 \text{ cell)} = [(\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times 500) \\ \div T = 1.924 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}})$$

V反总: 反应体系总体积, 2×10^{-4} L; ϵ : 2,6-二氯吡啶酚摩尔消光系数, 2.1×10^4 L/mol/cm; d: 比色皿光径, 1cm; V样: 加入样本体积, 0.01mL; 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, $1\text{mol}=10^9\text{nmol}$ 。

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。

$$\text{SDH活性 (U/mg prot)} = [(\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9] \div (\text{Cpr} \times V_{\text{样}}) \div T \\ = 1587.302 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div \text{Cpr}$$

(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。

$$\text{SDH活性 (U/g 质量)} = [(\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times W) \div T$$
$$= 1603.175 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div W$$

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。

$$\text{SDH活性 (U/10}^4 \text{ cell)} = [(\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}}) \div (\epsilon \times d) \times V_{\text{反总}} \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}} \times 500) \div T$$
$$= 3.207 \times (\Delta A_{\text{测定}} - \Delta A_{\text{空白}})$$

V反总: 反应体系总体积, $2 \times 10^4 \text{L}$; ϵ : 2,6-二氯吡啶酚摩尔消光系数, $2.1 \times 10^4 \text{L/mol/cm}$; 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, $1 \text{mol} = 10^9 \text{nmol}$ 。

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 (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。